



# Etude du métabolisme de *Rhodococcus rhodochrous* lors de la photobiodégradation du 2-aminobenzothiazole

Charlène Chorao

## ► To cite this version:

Charlène Chorao. Etude du métabolisme de *Rhodococcus rhodochrous* lors de la photobiodégradation du 2-aminobenzothiazole. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21880 . tel-00731145

**HAL Id: tel-00731145**

**<https://theses.hal.science/tel-00731145>**

Submitted on 12 Sep 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**  
(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES**

N° : 588

**THESE**

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**  
(Spécialité : Chimie Organique Biologique)

Par

**Charlène CHORAO**

Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand  
Diplômée de Master II de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

---

**ETUDE DU METABOLISME DE *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS*  
LORS DE LA PHOTOBIODEGRADATION DU  
2-AMINOBENZOTHIAZOLE : EFFET DE L'IMMOBILISATION DES  
CELLULES ET ROLE DU FER**

---

Soutenue publiquement le 24 Novembre 2008 devant la commission d'examen :

Président :

Coporteurs :

Examineurs :

Commission :

G. FONTY, DR-CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

J.-C. BLOCK, Pr, Université Henri Poincaré, Nancy-Université

P. MAZELLIER, Pr, Université Montesquieu, IUT Périgueux-Bordeaux IV

A.-M. DELORT, DR-CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2

G. MAILHOT, DR-CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2

R. BLIGNY, DR, CEA, Grenoble

P. BESSE-HOGGAN, CR-CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2



# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>9</b>
<b>I Présentation des benzothiazoles</b>	<b>10</b>
I.1 Structure	10
I.2 Utilisations	11
I.3 Propriétés générales	13
I.4 Toxicité	13
I.5 Présence des benzothiazoles dans l'environnement	15
<b>II Connaissances sur la dégradation des benzothiazoles</b>	<b>17</b>
II.1 Dégradation par voie biotique	17
II.1.1 Etudes effectuées avec des boues activées	17
II.1.2 Etudes effectuées avec des souches pures	20
II.2 Dégradation par voie photochimique	23
II.3 Dégradation combinant voies biotique et photochimique	25
II.4 Dégradation de l'ABT	26
II.4.1 Etude séparée des processus biotique et photochimique	27
II.4.2 Etude combinant les processus biotique et photochimique	29
II.4.3 Schémas récapitulatifs concernant la dégradation de l'ABT et du FeNTA	30
<b>III Le rôle du fer</b>	<b>33</b>
III.1 Généralités	33
III.1.1 Présence du fer dans le compartiment aquatique	33
III.1.2 Transformations du fer dans le compartiment aquatique	37
III.2 Rôle du fer comme photo-inducteur	39
III.3 Rôle du fer dans les processus enzymatiques	41
III.3.1 Généralités sur les oxygénases	43
III.3.2 Les mono-oxygénases	45
III.3.3 Les dioxygénases	47
<b>IV Immobilisation des cellules</b>	<b>52</b>
IV.1 Définition	52
IV.2 Généralités	52
IV.3 Les techniques d'immobilisation	53
IV.3.1 Adhésion à un support	54
IV.3.2 Inclusion dans des matrices poreuses	56
IV.3.2.1 Inclusion des cellules dans un gel	56
IV.3.2.2 Inclusion des cellules dans un support préformé	57
IV.3.3 Cellules immobilisées derrière une barrière	57
IV.3.4 Flocculation	58
IV.4 Immobilisation des cellules dans un gel d'alginate	59

IV.4.1	L'alginate	59
IV.4.1.1	Généralités	59
IV.4.1.2	Inclusion des cellules dans des billes d'alginate	61
IV.4.2	Exemples d'étude de dégradation par des souches immobilisées sur gel d'alginate	62
<b>V</b>	<b>RMN <i>in vivo</i></b>	<b>66</b>
V.1	Généralités	66
V.2	Mise en place d'une expérience de RMN <i>in vivo</i>	66
V.2.1	Systèmes non perfusés	67
V.2.1.1	Système pour des cellules anaérobies	67
V.2.1.2	Système avec des cellules aérobies	67
V.2.1.3	Les bioréacteurs	68
V.2.2	Système perfusé	69
V.3	RMN du $^{31}\text{P}$	69
V.3.1	Paramètres détectables par RMN $^{31}\text{P}$ <i>in vivo</i>	70
V.3.2	Exemples d'études réalisées par RMN $^{31}\text{P}$ <i>in vivo</i>	71
V.3.2.1	Etude RMN $^{31}\text{P}$ <i>in vivo</i> de la toxicité de la tellurite chez <i>Escherichia coli</i>	73
V.3.2.2	Mesure du pH intracellulaire par RMN du $^{31}\text{P}$ chez <i>Aspergillus niger</i>	76
V.4	RMN du $^{13}\text{C}$	77
	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>83</b>
<b>I</b>	<b>Mise en place des expériences de biodegradation</b>	<b>84</b>
I.1	Culture de <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	84
I.2	Immobilisation des cellules	85
I.3	Préparation des milieux de dégradation	86
I.4	Incubation	88
I.5	Extraits perchloriques	89
I.6	Expériences d'émulsification	90
<b>II</b>	<b>Techniques analytiques</b>	<b>91</b>
II.1	Prélèvements	91
II.2	Analyses de l'ABT, des métabolites et des photoproduits par HPLC	91
II.2.1	Analyses par HPLC	91
II.2.2	Pré-traitement SPE des échantillons contenant de l'alginate avant analyses HPLC	92
II.3	Analyses du fer par dosage UV-visible	95
II.4	Analyses par RMN	98
II.4.1	RMN $^1\text{H}$	98
II.4.1.1	RMN $^1\text{H}$ pour valider le traitement SPE	98
II.4.1.2	RMN $^1\text{H}$ pour l'étude du métabolisme de l'alginate par <i>R. rhodochrous</i>	99
II.4.2	Analyses du métabolisme par RMN <i>in vivo</i>	99
II.4.2.1	Description du système de RMN <i>in vivo</i>	99
II.4.2.2	Expériences avec lumière (conditions 1)	101
II.4.2.3	Expériences sans lumière (conditions 2)	101
II.4.2.3.1	Spectroscopie RMN $^{31}\text{P}$	102
II.4.2.3.2	Spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$	102
II.4.2.3.3	Analyses des extraits perchloriques	103
II.5	Mesure du Carbone Organique Total (TOC)	103



<b>RESULTATS</b>	<b>107</b>
<b>I Etude comparative de la dégradation de l'ABT : système avec cellules libres et système avec cellules immobilisées</b>	<b>108</b>
I.1 Etudes préalables liées à la présence d'alginate	109
I.1.1 Etat énergétique de <i>R. rhodochrous</i> dans la matrice d'alginate de calcium	109
I.1.2 Métabolisme de l'alginate par <i>R. rhodochrous</i>	110
I.1.3 Traitement des prélèvements pour l'élimination de l'alginate	111
I.1.4 Adsorption de l'ABT et du FeNTA sur l'alginate	115
I.2 Comparaison des deux systèmes	116
I.2.1 Procédé de biodégradation	116
I.2.2 Procédé en présence de FeNTA ( $\pm$ lumière)	118
I.2.3 Procédés combinés de photo et de biodégradation	121
I.3 Estimation du taux de minéralisation de l'ABT lors des procédés de biodégradation	124
I.3.1 Biodégradation de l'ABT en absence de FeNTA	127
I.3.2 Biodégradation de l'ABT en présence de FeNTA	127
I.4 Etude du recyclage des deux systèmes	129
I.5 Conclusions	133
<b>II Etude RMN <i>in vivo</i> <math>^{31}\text{P}</math> et <math>^{13}\text{C}</math> du métabolisme et du comportement de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> durant les procédés de photo-biodégradation</b>	<b>134</b>
II.1 Etude du métabolisme de <i>R. rhodochrous</i> OBT18	135
II.1.1 Etude RMN <i>in vivo</i> du $^{31}\text{P}$ du métabolisme énergétique	135
II.1.2 Etude RMN <i>in vivo</i> du $^{13}\text{C}$ du métabolisme du carbone	141
II.2 Comportement métabolique de <i>R. rhodochrous</i> lors des procédés de biodégradation de l'ABT en présence ou non de FeNTA	146
II.2.1 Expériences de biodégradation en présence ou non de FeNTA et en absence de lumière	146
II.2.2 Expériences de biodégradation en présence de FeNTA et de lumière	149
II.3 Conclusions	151
<b>III Rôle du fer dans les processus de photo- et de biodegradation de l'ABT</b>	<b>153</b>
III.1 Les complexes organiques de fer étudiés	153
III.1.1 Le complexe FeNTA	154
III.1.2 Le complexe FeEDDS	161
III.1.3 Le complexe Fe-citrate	172
III.1.4 Comparaison de la dégradation de l'ABT par <i>R. rhodochrous</i> avec les trois complexes organiques de fer : FeNTA, FeEDDS et Fe-citrate	177
III.2 Les oxydes ou oxy(hydr)oxydes de fer	178
III.3 Conclusion	183
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>187</b>
<b>TABLES DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>193</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>203</b>



# Chapitre 1

## INTRODUCTION



Nous sommes au début du XXI<sup>ème</sup> siècle et voilà que l'être humain s'inquiète de son avenir car la planète est en effervescence ; elle est bousculée par un progrès incessant, de plus en plus rapide et qui laisse derrière lui des traces parfois préjudiciables et ineffaçables. Illustrons ce constat par l'exemple qui marque le plus les esprits, celui du pétrole. L'usage du pétrole remonte à l'Antiquité où les civilisations mésopotamiennes le découvrent alors qu'elles creusent des puits pour avoir de l'eau potable. Elles lui attribuent des propriétés thérapeutiques, cosmétiques ainsi que combustibles. Puis, Byzantins et Vénitiens l'utilisent pour couler les navires ennemis au Moyen-Age. Jusque là son utilisation n'est que ponctuelle mais à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les Américains se rendent compte du potentiel de cette roche liquide et le premier puits est foré en Pennsylvanie. La ruée vers l'or noir commence... Les chimistes l'étudient, le distillent pour séparer ses composants ; les découvertes sont édifiantes : c'est le goudron, les lubrifiants, les solvants, les naphtha et l'essence ! L'industrie pétrolière est née et elle se place rapidement au centre de l'économie mondiale. Le pétrole est devenu une source d'énergie majeure car le XX<sup>ème</sup> siècle voit apparaître le moteur à explosion qui fonctionne avec l'essence. Il y a de plus en plus d'automobilistes, il faut construire des routes, il y a également les bateaux, les avions... Et puis apparaissent les plastiques, matériaux aux propriétés intéressantes et variées qui leur valent des utilisations diverses venant parfois remplacer celles du bois, du verre ou du métal. Le pétrole est sollicité de toutes parts, mais alors que sa consommation est de plus en plus abondante, son impact sur l'environnement est de plus en plus préoccupant. Parmi ses nombreux effets néfastes, on lui confère une part importante de responsabilité dans le réchauffement climatique puisque son utilisation comme carburant entraîne l'émission dans l'atmosphère de dioxyde de carbone, gaz à haut effet de serre.

Voilà donc l'une des explications aux inquiétudes actuelles de l'Homme : l'environnement est fragilisé et il en est la cause. Scie-t-il la branche sur laquelle il est assis ? Certains l'ont déjà compris depuis longtemps et ont mis en place des associations pour combattre ces actions autodestructrices, la plus célèbre restant Greenpeace, fondée en 1971. L'environnement s'est rapidement constitué sujet politique d'importance notamment dans les démocraties : outil de démagogie pour séduire le peuple ou réelle préoccupation ? Il est en tous cas devenu un domaine d'étude d'ampleur pour la Recherche Publique. Alors que l'association Environnement-Industrie apparaît très antinomique, c'est un sujet qui est désormais au cœur des politiques industrielles puisque les industries sont soumises par des lois

nationales ou internationales à respecter des normes de plus en plus restrictives pour répondre, par exemple, au Protocole de Kyoto ratifié aujourd'hui par 156 pays.

Parmi les impacts de ces avancées sur l'environnement, il y a les impacts sur l'eau, l'eau qui avec l'oxygène et la nourriture, constitue les trois éléments vitaux pour l'Homme. La pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques trouve principalement son origine dans l'industrie et dans l'agriculture. Une concentration trop importante en polluant rend ces eaux impropres à la consommation et entraîne une perturbation de l'équilibre des écosystèmes. Il devient alors essentiel de trouver des solutions de décontamination et les microorganismes font partie de ces solutions. Ainsi, des réacteurs contenant des bactéries peuvent être placés en aval de certaines usines de production, le recours à la bioremédiation peut être une solution judicieuse pour décontaminer des sites pollués par des pesticides, des herbicides ou bien sur lesquels il y a eu un déversement accidentel de produits chimiques. Ce mécanisme de nature biotique n'est pas le seul à intervenir dans la dégradation. La lumière solaire agissant par photolyse ou par photoproduction de radicaux oxydants ainsi que les interactions avec les constituants du sol peuvent jouer également des rôles importants dans les processus de détoxification.

Parmi les polluants organiques qui sont présents dans l'environnement, nous retrouvons des membres de la famille des **benzothiazoles**. Parmi eux, des fongicides, des médicaments, des composés de l'industrie du pneumatique car utilisés comme accélérateurs de vulcanisation... un panel de molécules aux propriétés intéressantes mais qui accèdent vite au statut de contaminants dès lors qu'elles sont présentes dans l'environnement de manière indésirable et non contrôlée.

Depuis plusieurs années, les laboratoires SEESIB (Laboratoire de Synthèse Et Etude des Systèmes d'Intérêt Biologique) et LPMM (Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire) s'intéressent à l'étude des mécanismes de bio- et phototransformation de ces polluants en solution aqueuse. Un processus original combinant la bio- et la photodégradation en présence d'un complexe de fer (FeNTA) a d'ailleurs été mis au point par ces deux laboratoires. Le travail de thèse que je présente dans ce manuscrit s'insère dans ce contexte. Il a pour objectif de mieux connaître et de mieux comprendre ces processus. Le projet de recherche a été centré sur l'étude de la transformation du **2-aminobenzothiazole**

(ABT) par la souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 et/ou sous l'action de la lumière en présence ou non de différentes formes de fer.

### **Les objectifs de cette thèse...**

Avant ce travail de thèse, seules des cellules bactériennes en suspension avaient été utilisées. Cependant on sait que dans l'environnement, les bactéries sont rarement sous forme planctonique mais immobilisées dans des bio-films ou des agrégats. Le premier objectif de ma thèse a donc été de comparer l'efficacité et les mécanismes de dégradation entre des cellules libres et des cellules immobilisées dans un gel d'alginate.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse était de mieux connaître le métabolisme de *Rhodococcus rhodochrous*. D'une part nous avons cherché à obtenir des informations sur le métabolisme phosphoré et carboné de cette bactérie issue de l'environnement, métabolisme jusque là non décrit. D'autre part nous avons voulu évaluer sa réponse à différents stress potentiels lors des processus de photo- et biodégradation.

Enfin, une troisième partie avait pour objectif de comprendre plus précisément le rôle joué par le fer lors des processus de biodégradation. La question était de savoir sous quelle forme le fer était biodisponible pour *Rhodococcus rhodochrous* et comment il activait la biodégradation de l'ABT.



## **Chapitre 2**

### **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I PRESENTATION DES BENZOTHAZOLES

### I.1 Structure

La famille des benzothiazoles est vaste et ne comprend que peu de composés naturels. Leur squelette est composé d'un cycle thiazole, cycle hétéroatomique à 5 chaînons, accolé à un cycle benzénique (**Figure 1**).

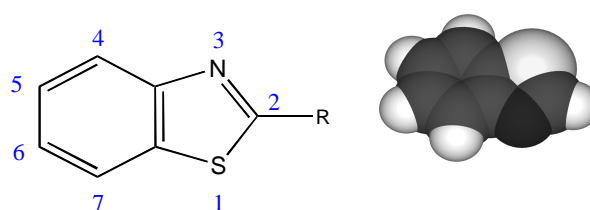


Figure 1 Squelette benzothiazole

Le **Tableau 1** réunit les noms et les acronymes de quelques benzothiazoles en fonction de la nature du substituant R.

R	NOM	ACRONYME
H	benzothiazole	BT
OH	hydroxybenzothiazole	OBT
NH <sub>2</sub>	aminobenzothiazole	ABT
SH	mercaptobenzothiazole	MBT
SO <sub>3</sub> H	acide benzothiazole sulfonique	BTSA
CH <sub>3</sub>	méthylbenzothiazole	MeBT
SCH <sub>3</sub>	méthylthiobenzothiazole	MTBT
SCH <sub>2</sub> SCN	thiocyanométhylthiobenzothiazole	TCMTB
SSBT	dithiobisbenzothiazole	MBTS

Tableau 1 Nom des benzothiazoles en fonction de la nature du substituant R

Parmi les quelques benzothiazoles d'origine naturelle, nous retrouvons le BT et le MeBT dans les feuilles de thé (Vitzthum et al., 1975) et le MBT dans la canneberge (Anjou et Von Sydow, 1967). Le BT est aussi un arôme que produisent les champignons *Polyporus frondosus* et *Aspergillus clavatus* (Seifert et King, 1982).

Les benzothiazoles et leurs dérivés sont essentiellement manufacturés pour de nombreuses et diverses applications.

## I.2 Utilisations

Les benzothiazoles étaient initialement employés comme colorants dans l'industrie du cuir ; ils trouvent aujourd'hui d'autres applications (**Figure 2**). Possédant à la fois un haut niveau de fluorescence et une facilité à se lier aux structures cellulaires, ils sont utilisés comme fluorochromes<sup>1</sup>. Des recherches menées depuis les années 1990 sur leur potentiel thérapeutique ont conduit au développement de médicaments : le riluzole, commercialisé sous le nom de RILUTEK<sup>®</sup> par la société Rhône-Poulenc, est prescrit dans le cas de la sclérose amyotrophique latérale (Bryson et al., 1996) ; le sulfathiazole (ou 4-amino-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)benzenesulfonamide) est un anti-infectieux présent dans les crèmes TRYSUL<sup>®</sup> et GYNE SULF<sup>®</sup> prescrites pour le traitement de certaines infections vaginales. Les activités antitumorales intéressantes du 2-(4-amino-3-méthylphényl)-5-fluorobenzothiazole (Trapani et al., 2003) et du 2-(4-amino-3phényl)benzothiazole (Bradshaw et al., 2008) en font des anticancéreux potentiels.

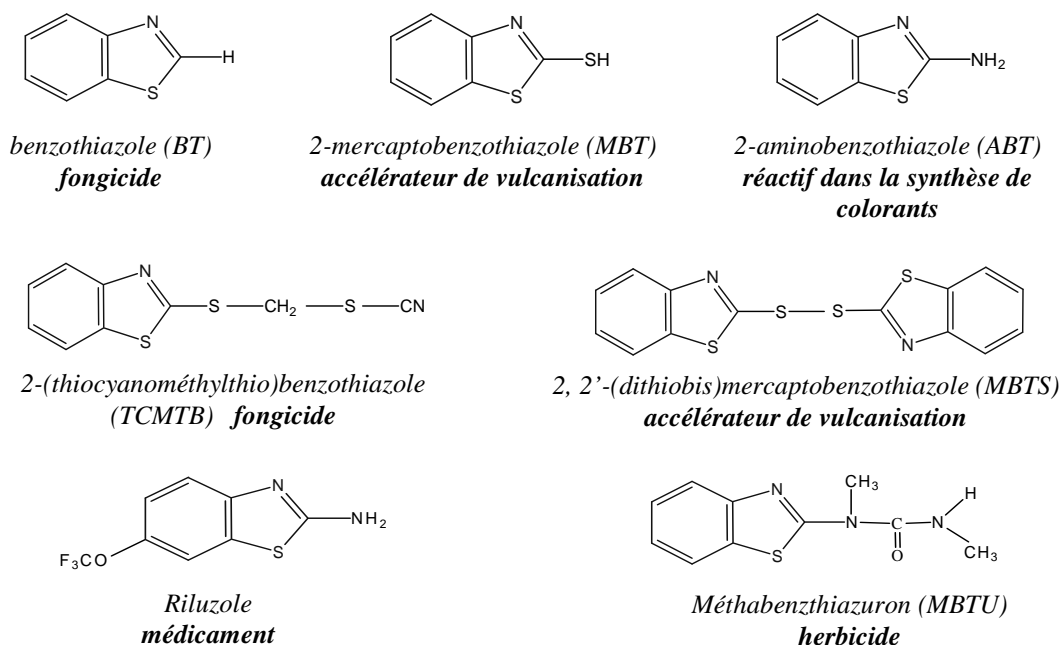


Figure 2 Exemples d'utilisation des benzothiazoles

<sup>1</sup> fluorochrome : molécule chimique capable d'émettre de la fluorescence après excitation



Le MBT et le MBTS sont les benzothiazoles les plus utilisés. Catalyseurs de la réaction de vulcanisation, une étape importante dans la fabrication des gommages, les deux composés sont très demandés par l'industrie du pneumatique. Découvert par Charles Goodyear en 1840, le procédé de vulcanisation est un processus chimique qui consiste à ajouter du soufre à la cuisson du caoutchouc pour éliminer les inconvénients d'une simple gomme, aux effets cassants avec le froid ou collants sous l'effet de la chaleur. Un caoutchouc vulcanisé est ainsi beaucoup plus résistant qu'un caoutchouc normal. Le TCMTB entre dans la composition du fongicide BUSAN<sup>®</sup> développé par les Laboratoires Buckman. Le produit est utilisé pour protéger le bois des attaques des champignons (Tsunoda, 1990). Le MBTU entre dans la composition des herbicides TRIBUNIL<sup>®</sup> et ORMET<sup>®</sup> commercialisés respectivement par les sociétés BAYER et PHYTORUS. Ces phytosanitaires sont notamment employés dans le traitement du blé et des pois protéagineux. Le 2-aminobenzothiazole ou ABT, intervient dans la fabrication des colorants diazoïques employés pour teindre le cuir (exemple **Figure 3**).

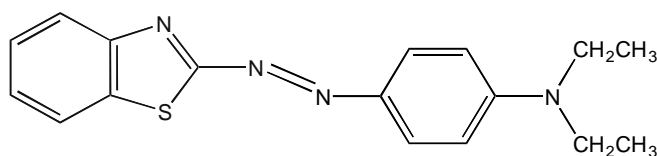


Figure 3 Colorant bleu ( $\lambda = 513 \text{ nm}$ ) synthétisé à partir de l'ABT (Podsiadły et al., 2005)

Le **Tableau 2** réunit quelques informations sur l'ABT.

AUTRE NOM	2- benzothiazolamine
FORMULE BRUTE	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S
POIDS MOLECULAIRE	150,20 g.mol <sup>-1</sup>
NUMERO CAS	136-95-8
POINT DE FUSION	129-134°C
POINT D'EBULLITION	décomposition
SOLUBILITES DANS CERTAINS SOLVANTS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- soluble dans les acides concentrés</li> <li>- soluble dans les alcools, l'éther et le chloroforme</li> </ul>
pK <sub>a</sub>	4,2

Tableau 2 Données sur l'ABT (d'après le site [www.acros.com](http://www.acros.com))

### I.3 Propriétés générales

Le **Tableau 3** présente quelques propriétés générales de ces composés : leur solubilité, leur pression de vapeur saturante qui caractérise leur volatilité et leur coefficient de partage octanol/eau<sup>1</sup> ( $pK_{ow}$ ) qui renseigne sur leur potentialité à se bioaccumuler.

	solubilité (mg/L)	pression de vapeur saturante (mmHg à 25°C)	$pK_{ow}$
BT	4300	$1,43.10^{-2}$	2,17
MBT	120	$4,64.10^{-4}$	2,86
TCMTB	125	$3,12.10^{-7}$	3,22
MBTS	10	$2,54.10^{-10}$	4,66
MTBT	125	$2,60.10^{-4}$	3,12
ABT	310,3	n.d.	2,00

Tableau 3 Propriétés générales des benzothiazoles (Kirouani-Hanari, 2003)

Le BT possède une forte solubilité dans l'eau et est volatil avec une pression de vapeur saturante forte. Le MBT, le MTBT et le TCMTB sont modérément solubles et non volatils. Le MBTS est très peu soluble et non volatil, l'ABT est faiblement soluble. Les valeurs positives des  $pK_{ow}$  obtenues prouvent que ces composés peuvent se bioaccumuler, tout particulièrement le MBTS qui a un  $pK_{ow}$  élevé.

### I.4 Toxicité

La plupart des benzothiazoles présentent des propriétés nocives envers les microorganismes, les animaux et les hommes. Dans le **Tableau 4** figurent les résultats du test normalisé Microtox<sup>®</sup> effectué sur différents benzothiazoles. Il s'agit de déterminer la concentration ( $CI_{50}$ ) en xénobiotique qui entraîne une inhibition de 50 % de la luminescence naturelle de la bactérie marine *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) (**Figure 4**).

<sup>1</sup> coefficient de partage octanol/eau : rapport des concentrations d'un composé dans chacune des deux phases eau et octanol après solubilisation dans le mélange eau/octanol

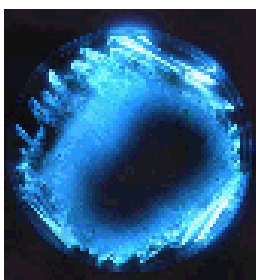


Figure 4 Mise en évidence de la toxicité aigüe de xénobiotiques (zones obscures) par inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri*

Benzothiazole	CI <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
2-mercaptobenzothiazole (MBT)	0,212
Benzothiazole (BT)	0,364
6-hydroxy -2-mercaptobenzothiazole (6OH-MBT)	1,318
2-hydroxybenzothiazole (OBT)	1,801
2-aminobenzothiazole (ABT)	6,347
2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT)	6,382
2-amino-6-hydroxybenzothiazole (6OH-ABT)	16,017
Méthabenzthiazuron (MBTU)	22,665
6-hydroxyméthabenzthiazuron (6OH-MBTU)	132,335
Acide 2-benzothiazolsulfonique (BTSA)	294,870

Tableau 4 Résultats du test Microtox<sup>®</sup> pour différents benzothiazoles ; temps d'exposition au toxique : 30 minutes (Malouki, 2004)

Nous constatons donc que parmi les composés testés le MBT est le plus toxique pour *Vibrio fischeri*. Le MBT induirait des tumeurs selon Gold et al. (1993). Il est reconnu également comme allergène provoquant des dermatites, une nocivité qu'il doit au groupement SH ; ceci est d'autant plus problématique qu'il est présent dans le caoutchouc des semelles de chaussures ou bien dans celui des gants (Jung et al., 1988 ; Chipinda et al., 2008). Sa DL<sub>50</sub><sup>1</sup> chez le rat par injection orale est de 100 mg/kg (Sax, 1984) ce qui d'après l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner le place dans les composés modérément toxiques ; pour éléments de comparaison, le sel de table a une DL<sub>50</sub> de 3000 mg/kg et le cyanure de 3 mg/kg.

<sup>1</sup> dose causant la mort de 50% d'une population donnée

### I.5 Présence des benzothiazoles dans l'environnement

Les benzothiazoles entrent dans l'environnement par diverses voies. Leur introduction principale se fait par les routes où se dépose la gomme des pneumatiques et c'est le lessivage de ces routes qui les conduit dans les sols et dans les différents compartiments aquatiques. Leur présence s'étend a fortiori au compartiment atmosphérique suite à la mise en suspension dans l'air des poussières des routes (Welch et Watts, 1990).

Les benzothiazoles sont également présents dans les stations de traitement des eaux en aval des tanneries et des manufactures de pneumatiques. Klopfer et son équipe les ont également mis en évidence dans l'eau à traiter de la station d'épuration municipale de Berlin-Ruhleben et les ont quantifiés en 2004 (**Tableau 5**).

	Concentration en ng/L dans l'eau à traiter
ABT	27
BT	852
MTBT	162
BTSA	1704
MBT	191
OHBT	501
<b>Total</b>	<b>19,8 nM</b>

*Tableau 5 Concentrations moyennes de divers benzothiazoles présents dans l'eau à traiter de la station d'épuration de Berlin-Ruhleben (Klopfer et al., 2004)*

Le **Tableau 6** est non exhaustif, il souligne l'existence des benzothiazoles dans différents compartiments et en différents points du monde.

pays	lieu de prélèvement de l'échantillon	benzothiazole	concentration
Allemagne	atmosphère	BT	déecté
Allemagne	eaux usées	BT	0,85 µg/L
Etats-Unis	eaux usées d'une industr. du caoutchouc	BT	20 et 60 µg/L
Etats-Unis	eaux usées d'une industr. du caoutchouc	MBT	0,54-0,71 mg/L
Etats-Unis	eaux de rivière	BT	2,3 et 23 µg/L
Etats-Unis	eau de consommation	MTBT	non quantifiable
Etats-Unis	eaux usées après fabrication du MBTS	MBT	0,5-1 mg/L
Etats-Unis	eaux usées après fabrication du MBTS	MBTS	35 µg/L
Antarctique	océan	MTBT	17 ng/L
Antarctique	océan	BT	6-37 ng/L

Tableau 6 Concentration en benzothiazoles dans différents compartiments  
(adapté de Kirouani-Hanari, 2003 et de Kloefer et al., 2005)



## II CONNAISSANCES SUR LA DEGRADATION DES BENZOTHIAZOLES

### II.1 Dégradation par voie biotique

#### II.1.1 Etudes effectuées avec des boues activées

Les premières études de biodégradation des benzothiazoles ont été réalisées avec des boues activées ou des cultures mixtes provenant directement des stations d'épuration d'usine qui fabriquent ou consomment ces composés.

**BT<sub>SO</sub><sub>3</sub>**. D'un point de vue historique, la première étude remonte à 1976. C'est Mainprize et al. (1976) qui se sont intéressés au devenir du BT<sub>SO</sub><sub>3</sub> en présence de boues activées. Les résultats furent encourageants puisqu'ils ont montré qu'à une concentration de 100 mg/L, le polluant était totalement biodégradé par des boues activées ; du sulfate et de l'ammoniaque, ayant pour origine le soufre et l'azote contenus dans le BT<sub>SO</sub><sub>3</sub>, ont été retrouvés en quantité quasi stoechiométrique. Le taux de carbone organique a diminué comme le taux de BT<sub>SO</sub><sub>3</sub> : il n'y a donc pas eu d'accumulation d'intermédiaires (**Figure 5**).

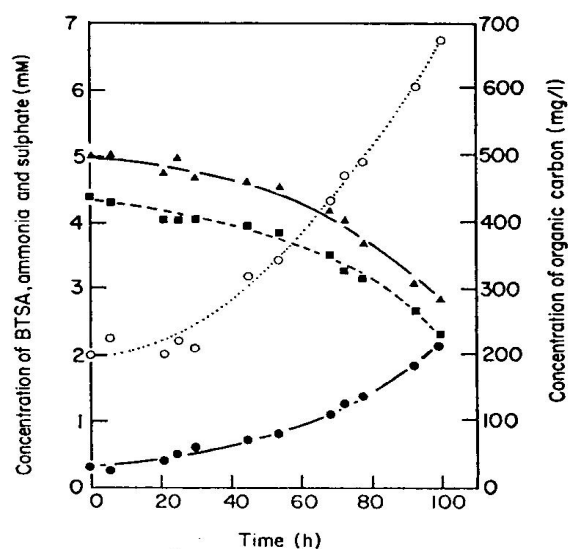


Figure 5 Concentration de différents éléments lors de la biodégradation du BT<sub>SO</sub><sub>3</sub> par des boues activées (▲) BT<sub>SO</sub><sub>3</sub> ; (●) ammonium ; (○) sulfate ; (■) carbone organique (d'après Mainprize et al., 1976)

**BT et MBT.** Repkina et al. (1983) ont étudié la dégradation aérobie du BT par des boues activées issues d'une station d'épuration municipale. Tant que les concentrations en BT sont inférieures à 300 mg/L, l'oxydation et la nitrification biochimiques du substrat ont lieu et le BT est complètement dégradé. A des concentrations supérieures, le processus de nitrification est inhibé. Cette expérience a également été réalisée avec le MBT seul mais sans succès. L'équipe de Reemtsma (1995) s'est aussi intéressée à la biodégradation du BT et du MBT par des cultures mixtes provenant d'une station d'épuration municipale. Ils ont travaillé à des concentrations en xénobiotiques plus faibles, de l'ordre du mg/L, et ont obtenu les résultats illustrés par la **Figure 6**.

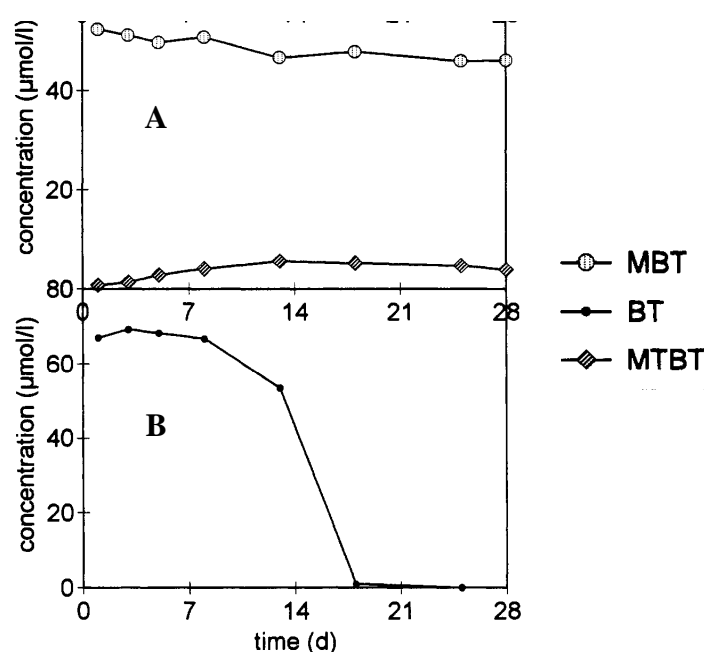


Figure 6 *Dégradation du MBT (A) et du BT (B) par des boues activées (Reemtsma et al., 1995)*

Après 28 jours, seul 10 % du MBT sont transformés par méthylation par l'enzyme bactérienne S-méthyltransférase et donnent du MTBT (**Figure 6, graphique A**). Le BT a quant à lui été complètement dégradé en 18 jours (**Figure 6, graphique B**). L'équipe de Repkina (1983) a montré en revanche que lorsque le MBT et le BT étaient en mélange comme dans les eaux usées, leur biodégradation était largement favorisée puisque complète pour des concentrations respectivement inférieures à 10 et 300 mg/L.

**TCMTB.** L'équipe de Reemtsma (1995) a montré que le TCMTB était dégradé à 95 % en 9 jours par le système de boues activées décrit dans le paragraphe précédent. Le produit majoritaire de cette biodégradation est le MBT mais le TCMTB s'est aussi transformé en BT (Figure 7).

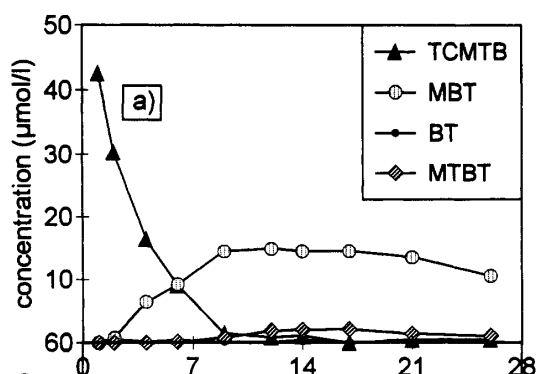


Figure 7 Dégradation du TCMTB par des boues activées (Reemtsma et al., 1995)

Suite à ces expériences, des voies métaboliques de transformation du TCMTB ont été suggérées (Figure 8).

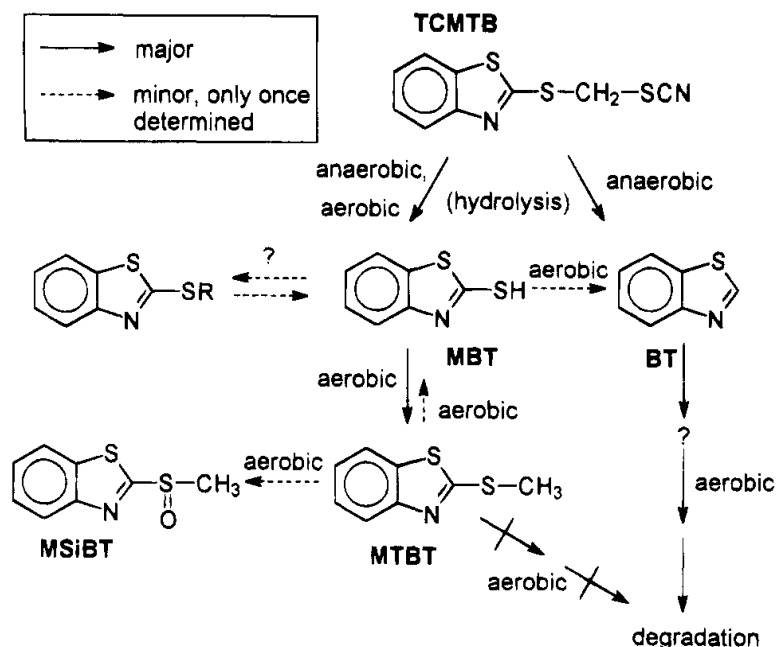


Figure 8 Voies métaboliques de dégradation du TCMTB proposées par Reemtsma et al. (1995)

### II.1.2 Etudes effectuées avec des souches pures

Des souches microbiennes pures capables de dégrader et de transformer les benzothiazoles ont été recherchées dans le but d'identifier avec plus de facilité les voies métaboliques mises en jeu. Différents microorganismes capables de dégrader ces composés dans des conditions aérobies ont été isolés. Plusieurs appartiennent à la famille des *Rhodococci*<sup>1</sup> (**Figure 9**).

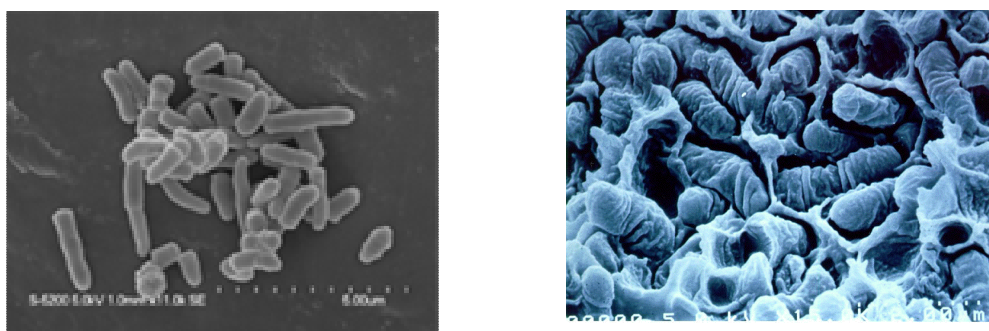


Figure 9 Rhodococcus erythropolis (à gauche) – Rhodococcus rhodochrous (à droite)

En 1998, l'équipe de De Wever isole une souche pure capable de transformer des benzothiazoles, *Rhodococcus erythropolis* BTSO<sub>3</sub>1. Cette souche est capable de dégrader l'OBT, le BT (**Figure 10**) et le BTSO<sub>3</sub> séparément ainsi qu'en mélange (**Figure 11**). En revanche, elle ne dégrade pas le MBT, ce composé inhibant même la dégradation de l'OBT, du BT et du BTSA lorsqu'il est ajouté au mélange des trois benzothiazoles.

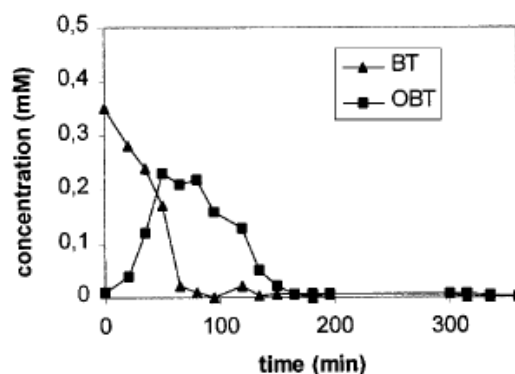


Figure 10 Transformation du BT par la souche *Rhodococcus erythropolis* BTSO<sub>3</sub>1. (De Wever et al., 1998)

<sup>1</sup> Les bactéries appartenant au genre *Rhodococcus* sont des bactéries à Gram positif ou à Gram variable. Elles sont partiellement acido-résistantes, aérobies, catalase positives, à métabolisme oxydatif et capables d'utiliser un large éventail de composés organiques comme unique source de carbone et d'énergie. La plupart des espèces se cultivent facilement à 30 °C sur les milieux d'usage courant.

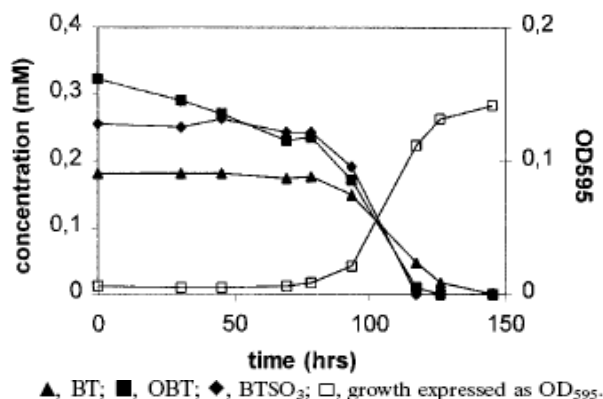


Figure 11 Croissance de la souche *Rhodococcus erythropolis* BTSO<sub>3</sub>I sur un mélange de BT, d'OBT et de BTSO<sub>3</sub> (De Wever et al., 1998)

L'équipe de De Wever a également isolé la souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 (De Wever et al., 1997) de la station de traitement des eaux de l'usine pharmaceutique Bayer en Belgique. Il a été montré que cette souche était capable de dégrader le BT et l'OBT (Besse et al., 2001), le MBT (Haroune et al., 2004) (**Figure 12**) mais pas le MBTU.

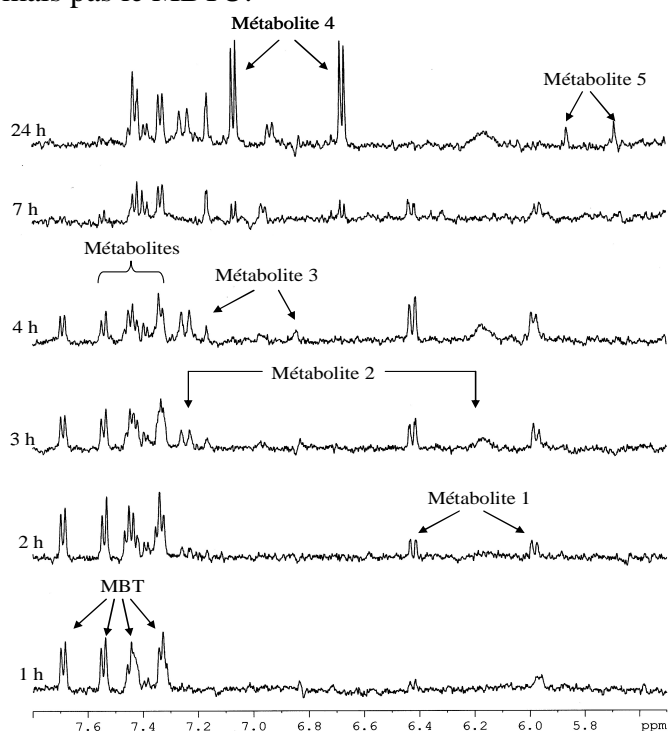


Figure 12 Etude par RMN <sup>1</sup>H in situ de la cinétique de dégradation du MBT (Haroune et al., 2004)

La dégradation de l'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 et par *Rhodococcus erythropolis* BT<sub>SO<sub>3</sub></sub>1 est faible et conduit au composé hydroxylé en position 6, le 6OH-ABT, qui s'accumule dans le milieu (**Figure 13**).

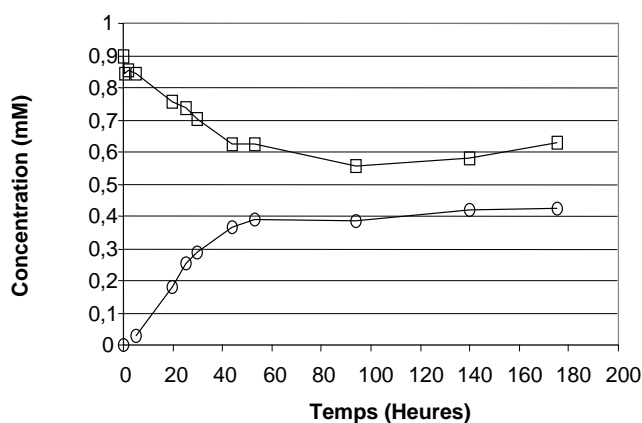


Figure 13 Cinétique de transformation de l'ABT (□) et de formation du 6OH-ABT (○) par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 (Haroune et al., 2001)

La littérature décrit maintenant quelques souches microbiennes pures capables de transformer les benzothiazoles. Le **Tableau 7** en rassemble certaines.

Souches	Benzothiazoles dégradés	Références
<b>Bactéries</b>		
- <i>Pseudomonas</i> sp.	MBT	Drotar et al., 1987
- <i>Pseudomonas</i> sp. HKT 554	BT, MBT	Matsui et al., 2004
- <i>Corynebacterium</i> sp.	MBT	Drotar et al., 1987
- <i>Rhodococcus rhodochrous</i> OBT18	BT, OBT, ABT, MBT	De Wever et al., 1997, Besse et al., 2001, Haroune et al., 2001, 2004, Bunescu et al., 2008a
- <i>Rhodococcus erythropolis</i> BT <sub>SO<sub>3</sub></sub> 1	BT, OBT, BTSA	De Wever et al., 1998, Besse et al., 2001, Haroune et al., 2001
- <i>Rhodococcus pyrinidinovorans</i> PA	BT, OBT	Gaja et Knapp 1997, Haroune et al., 2002
<b>Champignons</b>		
- <i>Cunninghamella echinulata</i>	MBTU	Wallnöfer et al., 1976
- <i>Hypocrea pilulifera</i>	MBTU	Goettfert et al., 1978
- <i>Aspergillus niger</i>	MBTU	Malouki et al., 2003

Tableau 7 Souches microbiennes et benzothiazoles sur lesquelles elles sont actives

## II.2 Dégradation par voie photochimique

Les processus photochimiques ont une influence considérable sur le devenir des composés dans l'eau. La lumière peut agir sur les composés organiques selon deux modes, par photolyse ou par photoinduction.

La photolyse se produit lorsque le composé absorbe directement la lumière solaire, il se forme alors des radicaux qui sont des espèces réactives.

La photodégradation est induite lorsque la lumière est absorbée par un autre composé présent dans le milieu et que celui-ci transmet son énergie au composé d'intérêt qui réagit alors ou que ce composé forme photochimiquement des radicaux oxydants susceptibles de dégrader le composé étudié. Parmi les espèces présentes dans les milieux aquatiques qui absorbent la lumière il y a les nitrates et les substances humiques. Les radicaux hydroxyles, les radicaux peroxydes, l'oxygène singulet sont les espèces oxydantes les plus courantes photogénérées à partir de ces composés. Ce phénomène explique pourquoi un composé peut ne pas être photodégradé dans une eau distillée alors qu'il l'est dans une eau naturelle.

Les premières études concernant la photochimie des thiols aromatiques ont débuté avec Oswald et son équipe (1963). En présence de lumière, les composés soufrés produisent des radicaux libres centrés sur le soufre et des ions radicaux. Ces espèces sont très réactives et constituent d'importants intermédiaires dans les réactions photochimiques.

Le BT et l'OBT absorbent très peu la lumière solaire ainsi ils ne sont que très peu photolysés (Fife et al., 1975).

En 1985, Párkányi et Abdelhamid ont étudié la photolyse du MBT dans des réacteurs en pyrex, en présence d'oxygène, avec des solvants organiques et en utilisant des lampes UV. La **Figure 14** présente le devenir du MBT lors de ce processus photochimique.



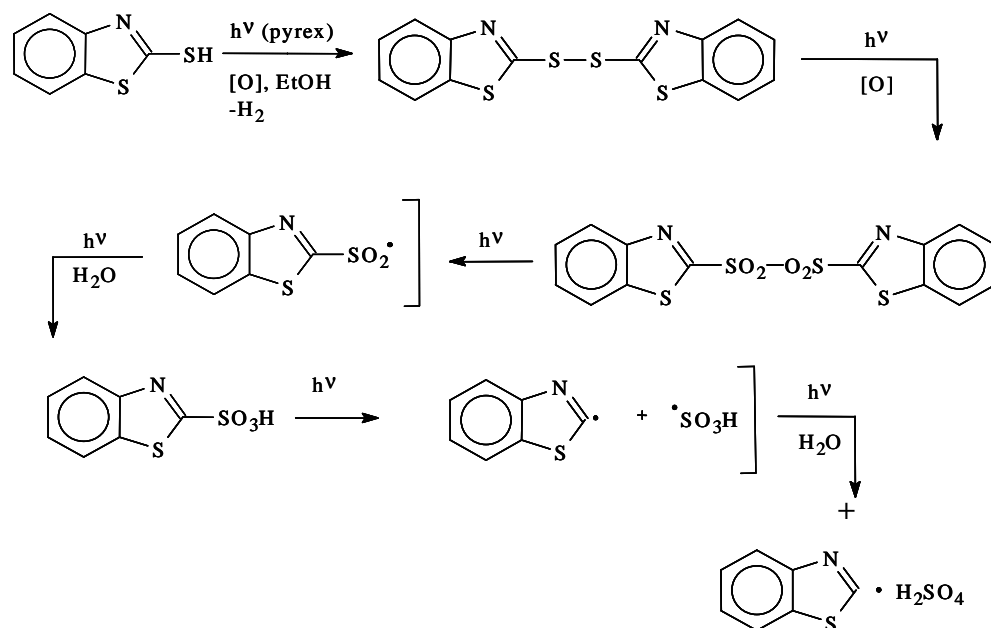


Figure 14 Mécanisme de photolyse du MBT en milieu organique (Párkányi et Abdelhamid, 1985)

Malouki et al. (2003) ont également étudié la photolyse du MBT à 313 nm et dans l'eau pour se placer dans les conditions de l'environnement et mimer le spectre solaire. Le composé s'est montré très réactif. Sous l'action de la lumière, le MBT a donné du BT et de l'OBT. Ces auteurs ont également mis en évidence l'influence que pouvaient avoir les constituants présents dans le milieu sur la phototransformation. Ils ont en effet étudié la dégradation du MBT dans l'eau Milli-Q et dans une eau de lac. La dégradation a été 4 fois plus importante dans l'eau du lac que dans l'eau Milli-Q. La photoinduction a été ici mise en évidence. L'eau du lac contenait d'autres espèces qui absorbent la lumière et qui ont généré des radicaux, espèces réagissant sur le MBT et induisant sa dégradation.

En 1992, Brownlee et al. ont montré que le TCMTB en milieu aqueux se dégradait très rapidement sous l'action de la lumière solaire donnant comme produit majoritaire le MBT avec 50% de rendement et des traces de BT. Ils ont également étudié la photolyse du MBT en milieu aqueux. Le composé a donné entre 30 et 45% de BT et entre 4 et 5% d'OBT (**Figure 15**).

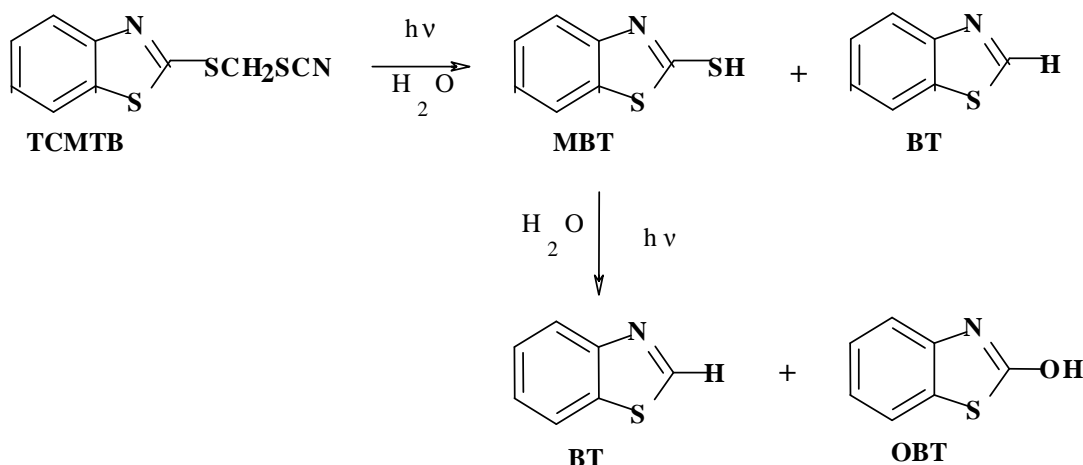


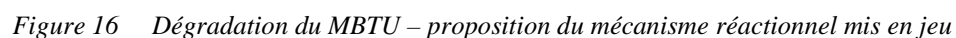
Figure 15 Schéma de dégradation photochimique du TCMTB (Brownlee et al., 1992)

Le MTBT n'est quant à lui pas sensible à la photolyse sous lumière solaire.

### II.3 Dégradation combinant voies biotique et photochimique

Il a été prouvé que la combinaison des deux méthodes (biotique et photochimique), qu'elle soit simultanée ou consécutive, pouvait avoir un effet synergique sur la dégradation. Différents exemples de la littérature illustrent ce résultat pour différents polluants organiques (Kot-Wasik et al., 2004 ; Wang et al., 2001). Concernant plus précisément les benzothiazoles, le cas du MBT a été décrit par l'équipe de Ranalli (2008) ainsi qu'une étude sur le MBTU réalisée au laboratoire (Malouki et al., 2003) et que nous allons détailler ci-après.

La dégradation du MBTU par la souche pure *Aspergillus niger* (Malouki et al., 2003) a conduit à la formation de dérivés hydroxylés majoritairement en position 6 mais également en position 5 du cycle benzénique. Ces métabolites s'accumulent dans le milieu. Le MBTU n'est pas photolysé à  $\lambda \geq 290$  nm contrairement au composé hydroxylé en position 6 qui a donné trois photoproduits, P1, P2 et P3 (**Figure 16**).



Lors de sa thèse (2006), Bunescu a étudié sa dégradation en combinant les processus biotique et photochimique.

#### II.4.1 Etude séparée des processus biotique et photochimique

Dans un premier temps, les processus biotique (souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18) et photochimique de dégradation de l'ABT ont été étudiés séparément (Bunescu, 2006). Des études sur la photolyse et la photodégradation induite ont également été menées. Pour cette dernière, le complexe aminopolycarboxylique de fer, FeNTA (NTA pour acide nitrilotriacétique) a été choisi comme photoinducteur (**Figure 17**).

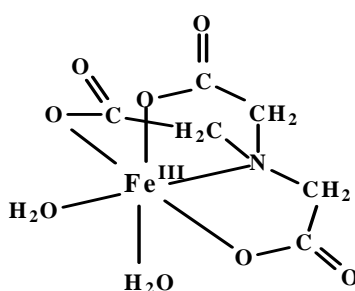


Figure 17 Structure du complexe FeNTA

Les expériences ont été réalisées à pH = 7 avec une concentration en ABT de 0,5 mM et en FeNTA de 1 mM, dans un photo-bioréacteur équipé de tubes fluorescents ( $300 \text{ nm} \leq \lambda \leq 500 \text{ nm}$ ). Les cinétiques ont été suivies par HPLC (**Figure 18**).

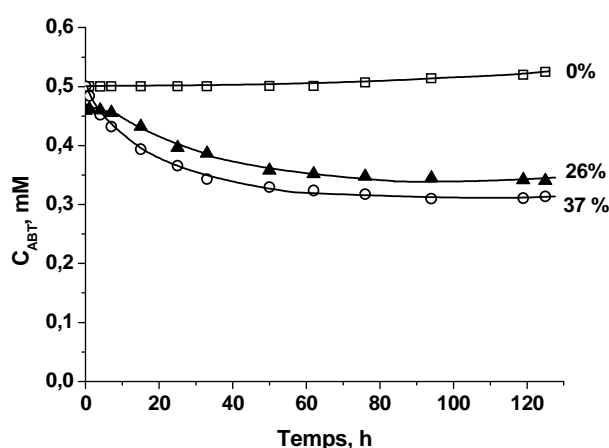


Figure 18 Cinétiques de dégradation de l'ABT  
 ▲ bactéries sans lumière ; □ photolyse ; ○ photodégradation induite par FeNTA

La biodégradation de l'ABT est faible : 26% après 125 heures d'incubation. Les analyses HPLC ont mis en évidence la formation de deux métabolites : M1 (**Figure 19**), qui après analyses structurales (thèse Haroune, 2003), s'est avéré être le 6OH-ABT et le métabolite M2a (**Figure 20**) dont le spectre UV est compatible avec celui d'une structure de catéchol.

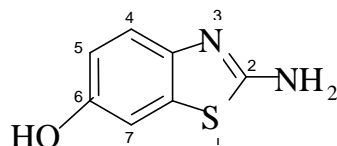


Figure 19 2-amino-6-hydroxybenzothiazole 6OH-ABT (M1)

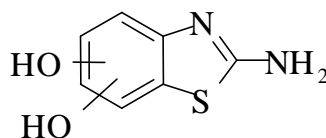


Figure 20 Métabolite M2a

Aucune transformation de l'ABT n'est observée pendant les 125 heures d'irradiation, confirmant l'absence d'action directe de la lumière sur l'ABT. Par contre, en présence du complexe FeNTA, 37% de l'ABT sont dégradés. Les analyses chromatographiques ont montré l'apparition de 3 photoproduits : le plus important, P1, correspond au 6OH-ABT ; le photoproduit P2, bien que possédant un temps de rétention équivalent à M2a, a un spectre UV-visible différent. L'hypothèse émise est celle de la formation d'un complexe entre le fer(III) et un catéchol (**Figure 21**) provenant d'une hydroxylation double de l'ABT. Le photoproduit P3 a été identifié comme étant le 4OH-ABT (**Figure 21**).

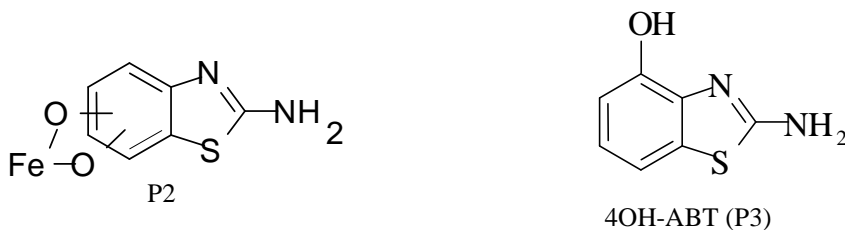


Figure 21 Photoproduit P2 et 2-amino-4-hydroxybenzothiazole 4OH-ABT (P3)

#### II.4.2 Etude combinant les processus biotique et photochimique

Les deux processus ont ensuite été couplés : 1) ABT en présence de bactéries et de lumière, 2) ABT en présence de bactéries et du complexe FeNTA, 3) ABT en présence de bactéries, de FeNTA et de lumière. Différentes expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment (ABT 0,5 mM et FeNTA 1 mM). La **Figure 22** illustre les résultats obtenus.

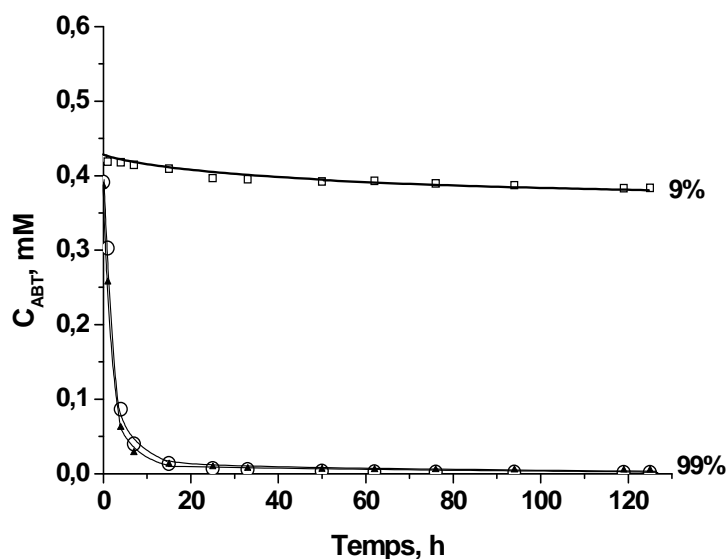


Figure 22 Cinétiques de dégradation de l'ABT  $\blacktriangle$  bactéries + FeNTA, sans lumière ;  $\square$  bactéries + lumière ;  $\circ$  bactéries + FeNTA + lumière

La lumière a un effet légèrement négatif puisque le taux de biodégradation a été limité à 9 % contre 26 % après 125 heures d'incubation en absence de lumière. Les analyses HPLC ont montré l'apparition des métabolites M1 et M2a. La présence du complexe FeNTA accélère fortement la biodégradation de l'ABT, avec ou sans lumière : la biodégradation est en effet quasi-totale après seulement 30 heures d'incubation. L'effet synergique dû aux actions biologiques et à la photochimie couplée aux espèces ferriques présentes en solution, a ainsi été clairement mis en évidence. Les expériences menées avec le FeNTA seul n'ont montré aucune dégradation de l'ABT à l'obscurité.

### II.4.3 Schémas récapitulatifs concernant la dégradation de l'ABT et du FeNTA

Les différentes voies de dégradation, voies photochimique, biologique et combinée, mises en évidence lors de la thèse de Bunescu (2006), sont résumées sur le schéma de la **Figure 23**.

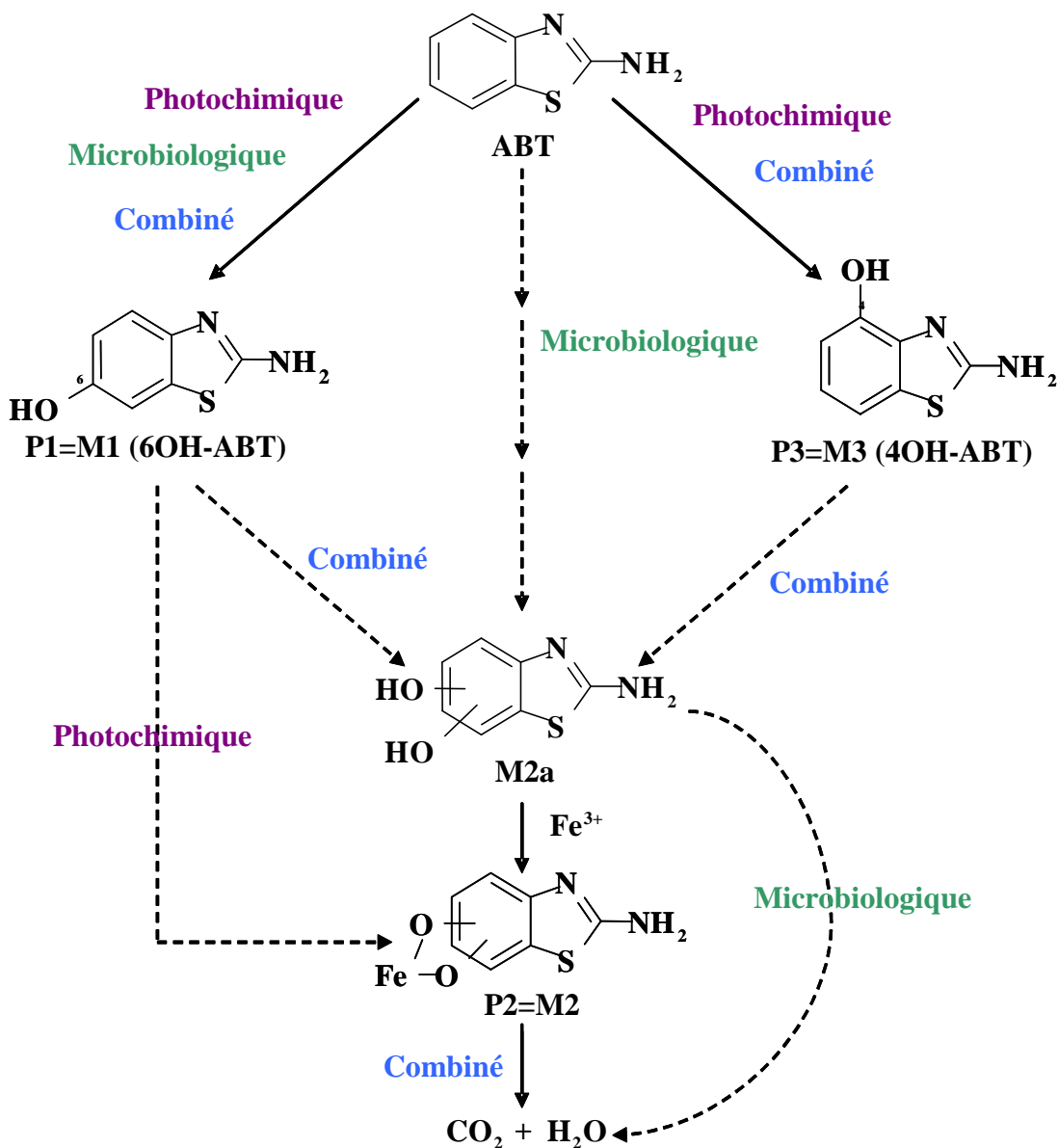


Figure 23

Voies de dégradation de l'ABT (Bunescu et al., 2008a)

Les équipes de Delort et Mailhot ont cherché à expliquer pourquoi en présence de FeNTA, la dégradation de l'ABT était activée soit photochimiquement, soit biologiquement. Pour cela, des études ont été menées en présence de lumière et/ou en présence de bactéries pour suivre le devenir du FeNTA. Les résultats obtenus couplés à des données de la littérature ont permis d'établir le schéma de la **Figure 24**.

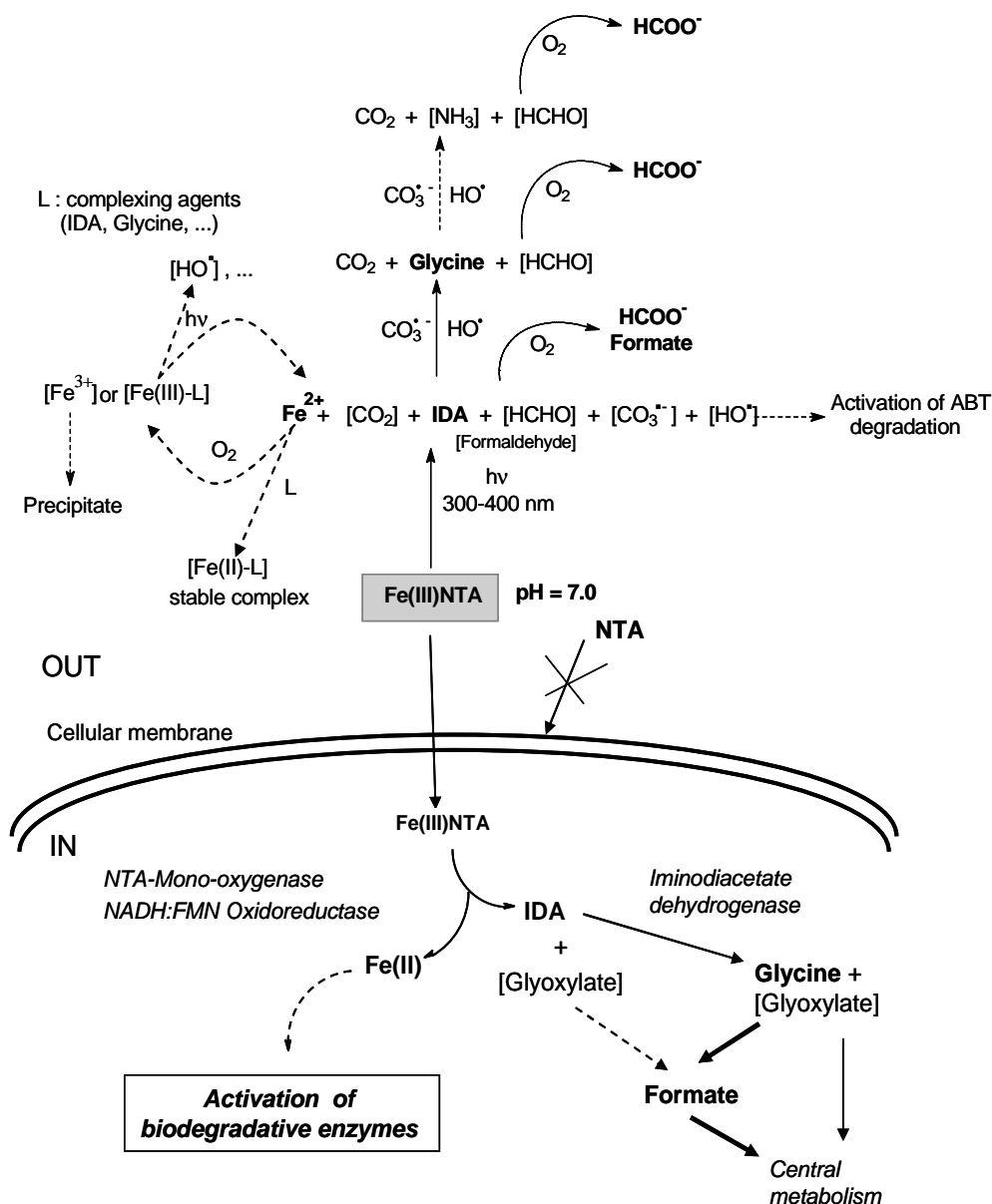


Figure 24 Proposition de mécanismes du FeNTA lors de sa photodégradation et de sa biodégradation par la souche *Rhodococcus rhodochrous* - les traits pleins sont des mécanismes prouvés par Bunesco et al., 2008b, les traits en pointillés sont des mécanismes proposés dans la littérature (Abida et al., 2006 ; Egli, 2001)



D'un point de vue photochimique, le complexe FeNTA est dégradé en IDA, glycine et formiate. Au cours de cette dégradation, le Fe(III) est réduit en Fe(II) et des radicaux  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  et  $\text{HO}^{\bullet}$  sont formés et attaquent l'ABT. D'un point de vue biologique, la transformation du complexe Fe(III)NTA dans la cellule se ferait grâce à l'action d'un complexe enzymatique NTA-Monooxygénase et NADH : FMN Oxydoréductase qui induit la formation d'IDA et la réduction du Fe(III) en Fe(II). L'IDA est ensuite transformé en métabolites identiques aux produits de dégradation issus de la voie photochimique (Glycine, formiate). Ces métabolites entrent ensuite dans le métabolisme central. L'accélération de la biodégradation serait liée à la production de Fe(II) qui activerait les enzymes intervenant dans la dégradation de l'ABT, possédant un atome de fer dans leur site actif (enzymes du type dioxygénase).

### III LE ROLE DU FER

Nous avons vu précédemment que le fer pouvait intervenir dans l'activation des enzymes de la dégradation de l'ABT ainsi que photochimiquement. Il est également connu pour être un élément clé dans l'environnement.

#### III.1 Généralités

##### III.1.1 Présence du fer dans le compartiment aquatique

La concentration en fer dans les eaux naturelles peut varier de 0,2 nM à 400  $\mu\text{M}$ . Le fer s'y trouve sous différentes spéciations et il peut être sous forme solide ou en solution (sels ou complexes). Sous forme solide, le fer est le plus souvent dans sa valence 3. Il se lie à des atomes d'oxygène pour former des oxydes ou des hydroxydes. Les plus communs sont l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), un oxyde rouge présent en abondance dans la nature du fait de sa grande stabilité thermodynamique, la goéthite ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) qui se présente sous forme de cristaux brun-noir dans la nature et la magnétite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), un oxyde formé de cristaux gris foncé qui est un intermédiaire lors de la thermolyse de la lépidocrocite ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ). Ces oxydes et hydroxydes sont présents dans le compartiment aquatique naturel, soit dans les sédiments soit en suspension. Ils ne constituent évidemment pas les seules espèces présentes dans ces eaux naturelles. Les carboxylates, phénolates, anions inorganiques (chlorures) s'avèrent être de forts ligands du fer et de ce fait, peuvent engendrer la dissolution des oxydes et des hydroxydes.

Le fer présent dans le compartiment aquatique peut également exister sous forme soluble, il forme des complexes aqueux comme le  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  (**Figure 25**),  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ ,  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^+$ ,  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]$ ,  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]^-$ .

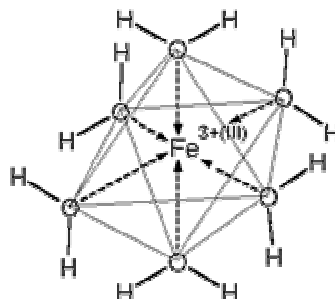


Figure 25

Complexe aqueux de fer : le complexe hexaaquafer(III)

Les conditions environnementales (notamment le pH, la concentration en fer) expliquent pourquoi nous retrouvons majoritairement du fer (III) dans les milieux naturels. Pour le comprendre, il suffit de se reporter au diagramme de la **Figure 26**.

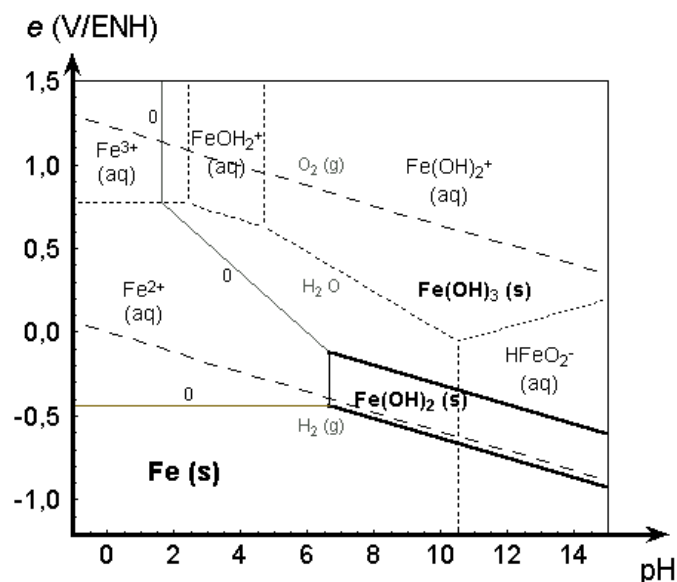


Figure 26 Diagramme potentiel/pH du fer

En 1986, Eberle et Palmer ont mesuré les concentrations en fer dans les eaux du Rhin et identifié ses spéciations. La majeure partie du fer (III) était finalement sous formes non solubles attribuées à des oxydes, des colloïdes de grandes tailles ou des complexes avec la matière organique (**Tableau 8**).

Espèce	Concentration / composition
fer (III) total	407 $\mu\text{g.L}^{-1}$
dont fer(III) dissous	1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dont 39% de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^{3+}$ 28% de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]$ 13% de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]^-$

Tableau 8 Composition en fer (III) de l'eau du Rhin (Eberle et Palmer, 1986)

Dans les conditions typiques d'un milieu aquatique naturel, les oxyhydroxydes et les oxydes de fer(III) sont généralement peu solubles et la

concentration en fer(III) dissous qui est en équilibre avec ces espèces solides est très faible. Le pH a cependant son influence sur la solubilité du fer puisque plus le pH est acide et plus la quantité de fer solubilisée est importante. La présence d'agents complexants de métaux comme les acides amino(poly)carboxyliques (**Figure 27**, **Figure 28**, **Figure 29**) augmente elle aussi la quantité de fer dissous dans ces milieux aquatiques en formant des complexes de fer solubles.

Les acides amino(poly)carboxyliques n'absorbent pas la lumière solaire, ils ne sont donc pas photodégradables dans l'environnement. Ce sont des composés très utilisés dans l'industrie des détergents, dans l'industrie pharmaceutique et textile, dans la photographie et dans la phytoremédiation. Nous pouvons citer l'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA), l'acide cyclohexanediaminotétraacétique (CDTA), l'acide N-hydroxyéthylène diaminotriacétique (HEDTA), l'acide nitrilotriacétique (NTA) et l'acide iminodiacétique (IDA) - l'IDA est un produit issu de la dégradation biologique et photochimique du NTA – qui se retrouvent dans les effluents domestiques et industriels.

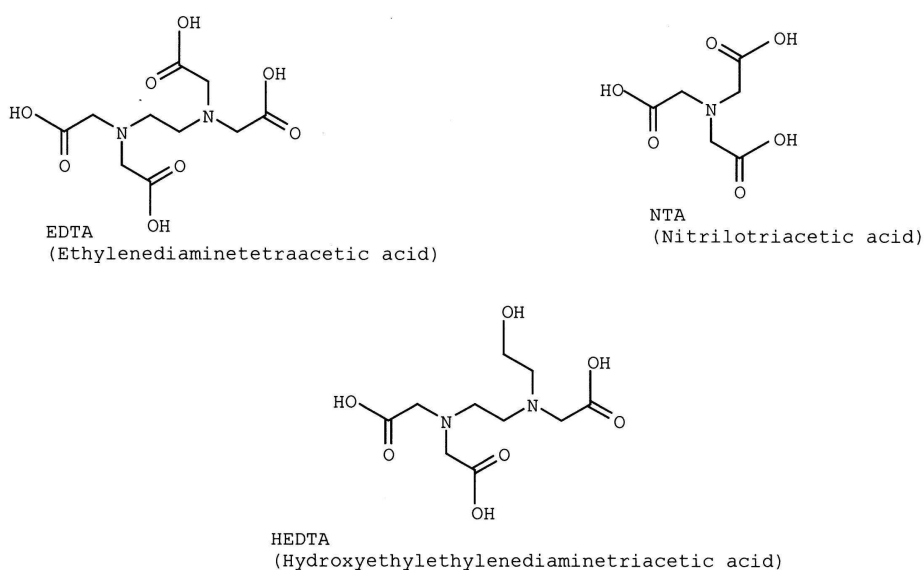


Figure 27 Formules des principaux acides aminopolycarboxyliques synthétiques (Egli, 2001)

Certains acides amino(poly)carboxyliques sont produits naturellement dans l'environnement par des plantes ou des microorganismes. Grâce à leur pouvoir chélatant, ils permettent l'intégration des métaux par ces organismes. Parmi eux, l'EDDS (acide éthylènediamino disuccinique), qui est un isomère de l'EDTA, est un

sidérophore<sup>1</sup> produit par l'actinomycète *Amycolatopsis orientalis* (Zwicker et al., 1997) ; la rhizoferrine est un sidérophore isolé du champignon *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (Drechsel et al., 1991). Citons également la rhizobactine, un sidérophore isolé de *Rhizobium meliloti* (Persmark et al., 1993) et la staphyloferrine A isolée de *Staphylococcus hyicus* (Meiwees et al., 1990).

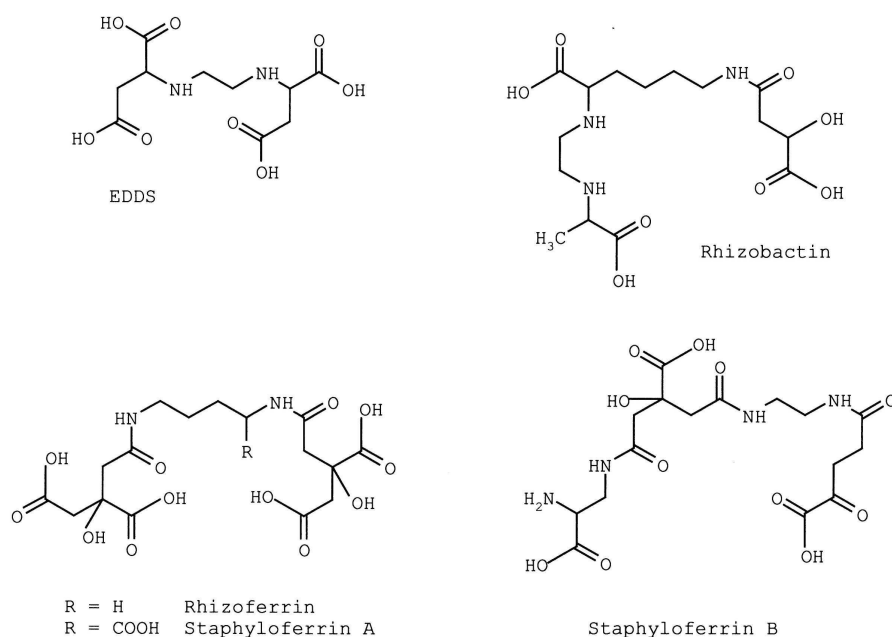


Figure 28 Formules des principaux acides aminopolycarboxyliques d'origine naturelle (Egli, 2001)

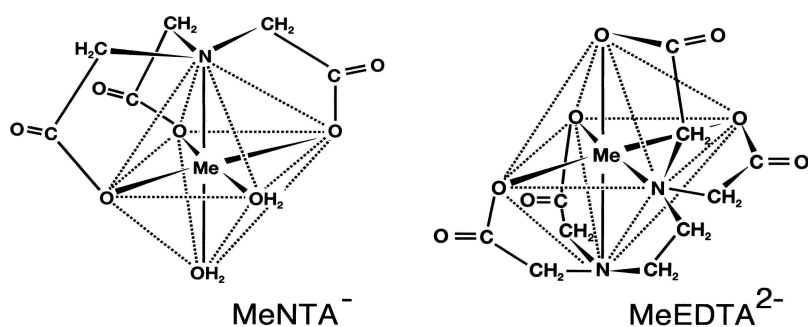


Figure 29 Structures des complexes Métal-NTA et Métal-EDTA

<sup>1</sup> molécule sécrétée par les microorganismes qui est capable de chélater l'ion Fe<sup>3+</sup>

La présence de ces complexes en solution aqueuse peut avoir un rôle important sur la capacité photo-oxydante du milieu car les complexes organiques de fer absorbent jusque dans le visible (confère **paragraphe III.1.2**).

### III.1.2 Transformations du fer dans le compartiment aquatique

La chimie du fer en solution aqueuse est relativement complexe car le fer peut être impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, d'hydrolyse, de complexation, de dissolution... des réactions qui, en plus de dépendre des conditions du milieu, dépendent les unes des autres et s'inscrivent dans un cycle dont une partie est schématisée ci-après (**Figure 30**).

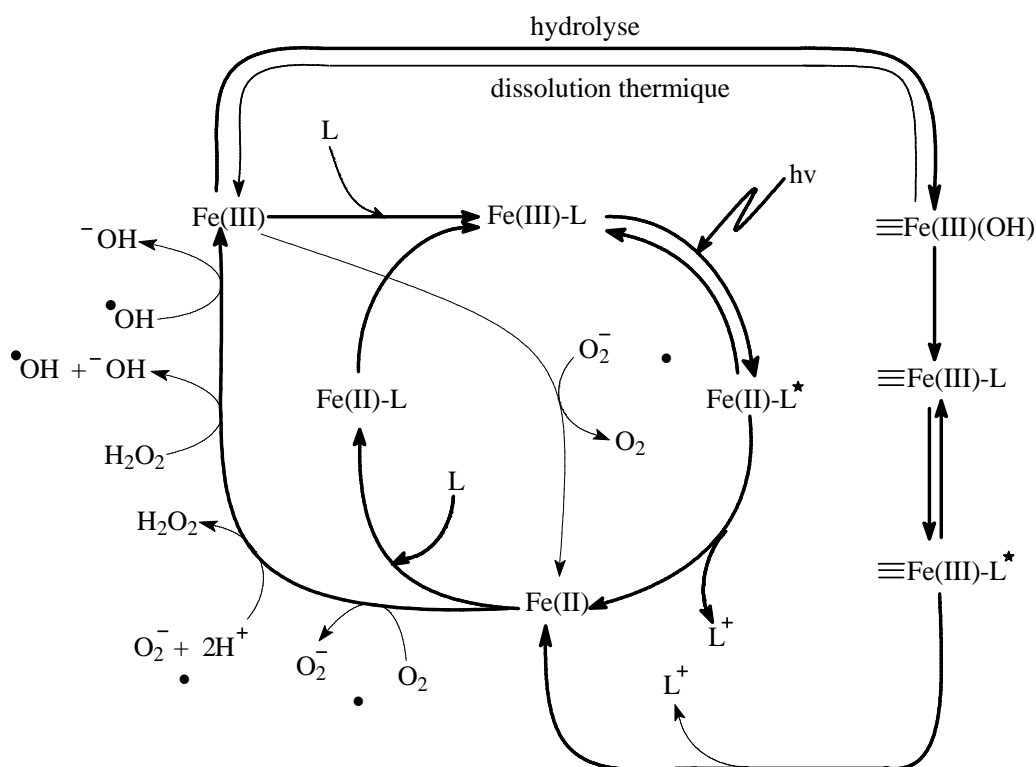
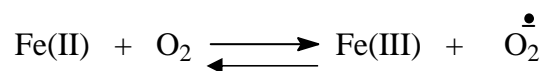
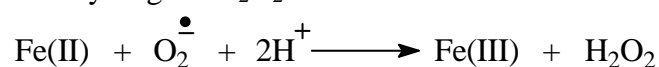


Figure 30 Schéma des différentes transformations de fer(III) et fer(II) qui peuvent se produire en solution aqueuse :  $\text{Fe(II)-L}$  et  $\text{Fe(III)-L}$  représentent le fer ferreux et ferrique complexés par un ligand  $L$ ,  $\equiv\text{Fe(III)(OH)}$  et  $\equiv\text{Fe(III)-L}$  représentent les espèces attachées à la surface d'(oxy)hydroxydes de fer et  $\text{Fe(II)}$  et  $\text{Fe(III)}$  représentent les ions ferreux et ferriques aqueux

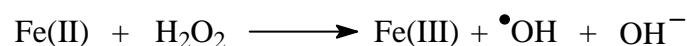
En présence d'oxygène, le fer (II) s'oxyde en fer(III). Cette oxydation est d'autant plus rapide que le pH est basique car l'oxygène présente une plus grande réactivité avec les formes  $\text{Fe}(\text{OH})^+$  et  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  qu'avec l'espèce  $\text{Fe}^{2+}$ .



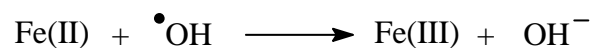
Lors de cette oxydation est produit le radical superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , une espèce peu réactive mais qui, en présence de fer(II) et de protons, génère du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



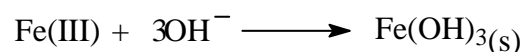
Le peroxyde d'hydrogène est ensuite impliqué dans une réaction découverte par Fenton à la fin du XIXe siècle et qui porte son nom, conduisant à la formation de radicaux  $\bullet\text{OH}$  :



Les radicaux  $\bullet\text{OH}$  sont des espèces très réactives qui peuvent oxyder le fer(II) en fer(III) :



Le fer(III) produit peut former un hydroxyde si le pH le permet et ainsi précipiter.



Le Fe(III) peut également, comme le montre la **Figure 30**, réagir avec de la matière organique et former un complexe Fe(III)-L ou être réduit par des mécanismes de photooxydoréduction à partir du complexe Fe(III)-L ou par réduction avec le radical superoxyde.

Nous apercevons là, la complexité des transformations du fer en solution aqueuse. Partout, elles ont un rôle primordial en maintenant une disponibilité du fer soluble pour les organismes aquatiques.

### III.2 Rôle du fer comme photo-inducteur

Parmi les différents traitements qui existent pour éliminer les composés organiques qui n'absorbent pas ou peu la lumière solaire, les réactions en solution aqueuse faisant intervenir les radicaux se sont avérées prometteuses. Ainsi, dans les années 90 ce sont développés les procédés d'oxydation avancée ou AOP (Advanced Oxidation Processes).

Les radicaux hydroxyles sont des espèces fortement réactives ayant un potentiel d'oxydation élevé de  $E^{\circ} = + 2,8 \text{ V}$ . Ils sont donc capables d'attaquer et d'oxyder de manière non sélective la plupart des composés organiques. En présence de fer, ces radicaux peuvent être formés de trois manières différentes. Sous photo-excitation, le fer(III) peut produire ces radicaux soit seul, soit en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (avec ou sans lumière: processus Fenton et photo-Fenton). Troisième possibilité, en milieu aqueux et sous irradiation UV, les complexes de fer(III) de petits poids moléculaires subissent une réduction en fer(II) accompagnée d'une production du radical hydroxyle, le fer(II) peut être de nouveau réoxydé en fer(III) en présence d'oxydants tels que l'oxygène dissous (**Figure 31**).

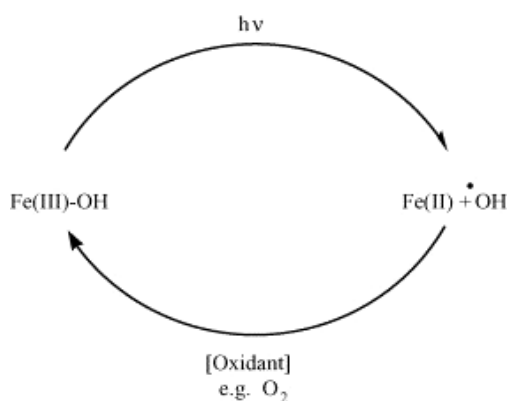


Figure 31 Cycle photocatalytique du fer(III) en solution aqueuse

La photochimie des complexes aqueux de fer et son impact sur la dégradation des polluants organiques a été largement étudiée. Citons l'équipe suisse de Sarria (2003) qui a publié des travaux sur la dégradation de l'AMBI ou 5-amino-6-méthyl-2-benzimidazolone (précurseur largement utilisé dans l'industrie des colorants), citons la dégradation du 2-chlorophénol (Kawaguchi et Inagaki, 1994), celle du 3-chlorophénol (Mazellier et Bolte, 2001), du 4-chlorophénol (Mazellier et al., 1999), et du 2,6-diméthylphénol (Mazellier et al., 1997a). Nous pouvons évoquer



d'autres exemples que sont ceux de la dégradation du diuron (Mazellier et al, 1997b), de l'asulam (Catastini et al., 2002) et du monuron (Mestankova et al., 2004), tous trois des herbicides, la dégradation du dibutylphtalate, un plastifiant (Bajt et al., 2001) ainsi que celle de l'acide benzoïque (Andreozzi et Marotta, 2004).

La photodégradation peut également être induite par un complexe de fer d'origine organique, notamment par les complexes polycarboxyliques et aminopolycarboxyliques de fer, comme le montrent Balmer et Sulzberger (1999) dans leur étude sur la dégradation de l'atrazine photoinduite par le complexe ferrioxalate et Abida et al. (2006) sur la transformation du 4-chlorophénol (4-CP) photoinduite par un complexe organique de fer, le complexe Fe(III)-acide nitrilotriacétique (NTA). Nous allons évoquer plus en détails le cas de la dégradation du 4-CP par le FeNTA car cet exemple se rapproche de notre étude.

### Dégradation du 4-chlorophénol (4-CP)

Dans l'étude réalisée par Abida et al. (2006) sur la dégradation du 4-CP, c'est le complexe FeNTA qui a été choisi car il est un bon modèle de la matrice organique naturelle. Le 4-CP n'absorbe pas à des longueurs d'onde supérieures à 310 nm. L'étude de sa dégradation photoinduite par le complexe FeNTA a été réalisée à  $\lambda = 365$  nm, il n'y a donc pas de photolyse du 4-CP dans ce cas. La **Figure 32** montre l'influence de la concentration en FeNTA sur la dégradation du 4-CP.

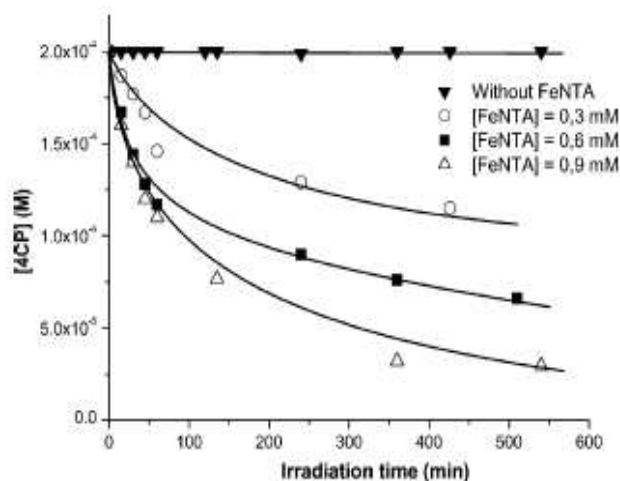


Figure 32 Cinétiques de photodégradation du 4-CP (0,2 mM) en fonction de différentes concentrations en FeNTA ; pH = 4. (Abida et al., 2006)

Le processus de dégradation mis en évidence fait intervenir une réaction d'oxydoréduction au sein du complexe FeNTA. Cette réaction conduit au radical  $\text{RCO}_2^\bullet$  qui, en présence de dioxygène, est à l'origine de la production du radical  $^\bullet\text{OH}$  après une réaction de Fenton. Le 4-CP est alors attaqué par le radical hydroxyle (**Figure 33**).

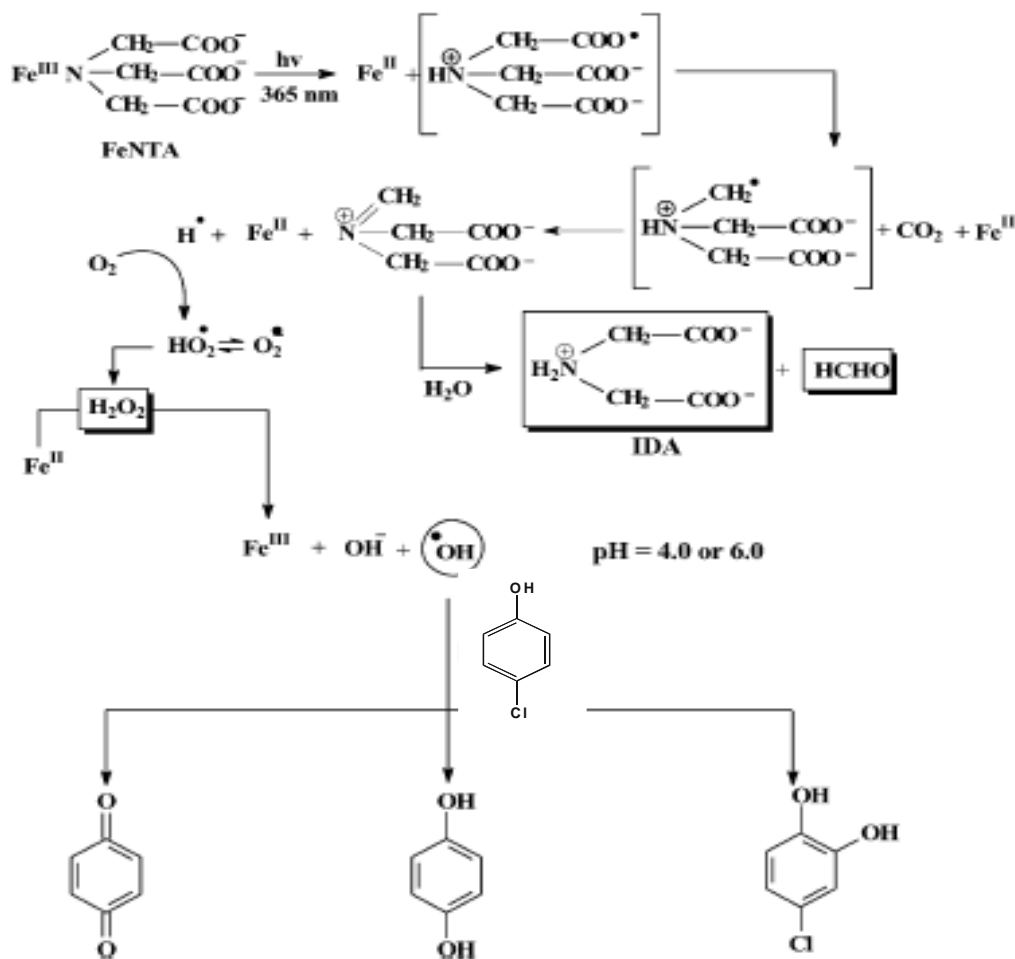


Figure 33 Dégradation du 4-CP photoinduite par le complexe FeNTA à  $\lambda = 365\text{ nm}$  (Abida et al., 2006)

### III.3 Rôle du fer dans les processus enzymatiques

Le fer constitue le 4<sup>ème</sup> élément le plus abondant de l'écorce terrestre, il est le métal de transition le plus présent dans l'environnement (roches, sols, eau, atmosphère). Cet élément est partout et ce n'est pas un hasard. Il est en effet essentiel

à la vie de nombreuses espèces végétales, animales et à l'Homme puisqu'il est impliqué dans le transport, le stockage et l'activation de l'oxygène, ainsi que de nombreuses réactions du métabolisme. Le **Tableau 9** répertorie quelques exemples de protéines à fer et leurs fonctions biologiques.

Protéine	Fonction
Cytochrome	Transporteur dans la chaîne respiratoire
Flavocytochrome	Enzymes d'oxydoréduction
Flavoprotéines diverses	Enzymes d'oxydoréduction, transporteurs
Cytochrome P-450	Mono-oxygénases
Catalase, peroxydase	Elimination de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , oxydations
Superoxyde dismutase à Fe	Elimination des radicaux superoxyde
Mono-oxygénase non héminique	Hydroxylations, O-déméthylations, ...
Dioxygénase	Ouverture du noyau aromatique
Ferrédoxines, rubrédoxines	Transporteurs d'électrons
Hydrogénase, protéine Fe/S	Métabolismes de H <sub>2</sub> , transport d'électrons
Ribonucléotide réductase	Synthèse des désoxyribonucléotides (ADN)
Aconitate hydratase	Conversion citrate/isocitrate (cycle de Krebs)

Tableau 9 Exemples de protéines liées au fer et leurs fonctions biologiques

La dégradation des composés organiques par les microorganismes aérobies débute généralement par une ou plusieurs étapes d'oxydation. L'introduction de groupements polaires augmente en effet le caractère hydrophile du composé, sa biodisponibilité et facilite son excrétion.

Parmi ces réactions d'oxydation, les réactions d'oxygénation tiennent une place importante et constituent souvent les étapes initiales d'un processus de biodégradation. Ces réactions consistent à introduire sur le composé cible un ou deux atomes d'oxygène provenant de l'O<sub>2</sub> de l'air après rupture de la liaison O=O. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont appelées oxygénases.

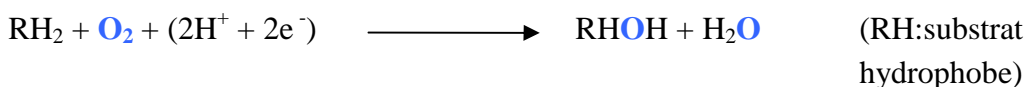
### III.3.1 Généralités sur les oxygénases

Les oxygénases sont des enzymes qui utilisent le dioxygène de l'air, un co-facteur et un métal de transition. Elles ont été découvertes en 1955 par les équipes d'Hayaishi et de Mason.

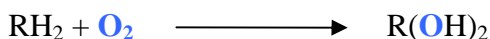
Chez les micro-organismes, ces enzymes interviennent très largement dans les voies métaboliques. Elles initient la dégradation des composés aromatiques à la fois en hydroxylant le cycle aromatique et en catalysant la réaction de clivage du cycle ; elles catalysent également la réaction initiale de dégradation des alcanes.

Il y a deux familles d'oxygénases : les mono-oxygénases et les dioxygénases. Les réactions qu'elles catalysent se résument ainsi :

#### Mono-oxygénases



#### Dioxygénases



Au sein des ces enzymes, le fer peut être présent sous trois formes différentes :

- soit il est intégré dans un hème (**Figure 34**): l'atome de fer situé au centre d'un cycle porphyrine va accueillir le dioxygène O<sub>2</sub>

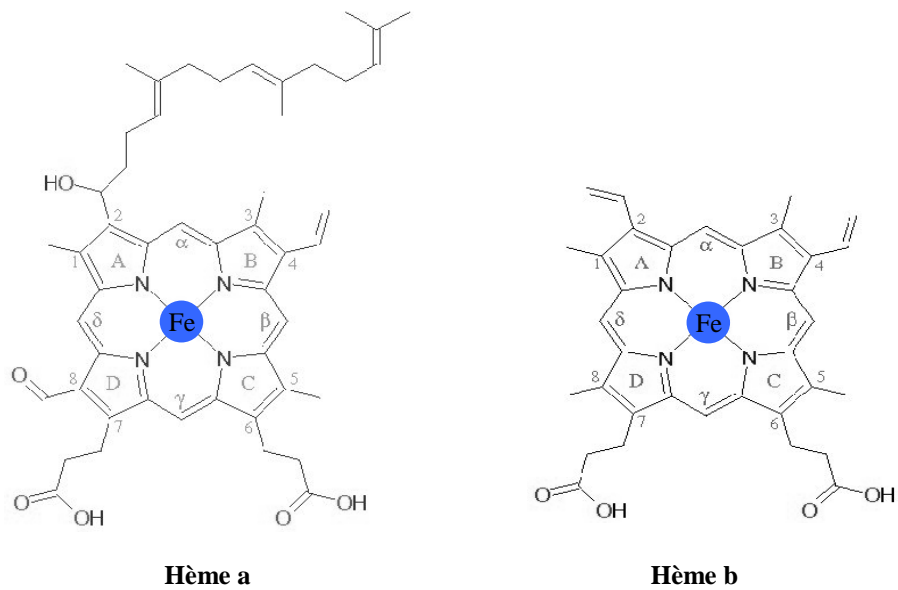


Figure 34 Hèmes contenant un atome de fer

♦ soit il est intégré dans un cluster fer-soufre au sein de la protéine (**Figure 35**) : les atomes de fer sont coordonnés à des atomes de soufre de la cystéine par exemple

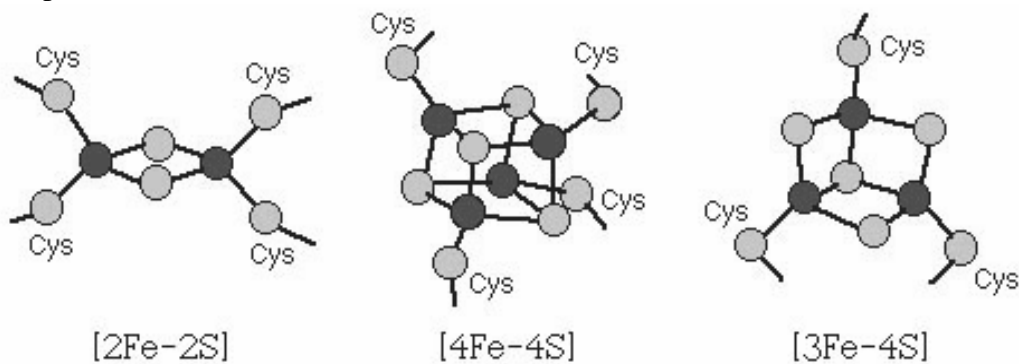


Figure 35 Exemples de clusters fer-soufre

♦ soit il est directement coordonné à des acides aminés de la protéine (coordination avec les atomes d'azote de l'histidine, coordination avec la tyrosine)

### III.3.2 Les mono-oxygénases

Les mono-oxygénases présentes chez les bactéries sont principalement des mono-oxygénases hémiques et des mono-oxygénases flaviniques, ces dernières ne faisant pas intervenir le fer.

Les mono-oxygénases hémiques comptent une famille importante de composés, les cytochromes P-450 dont la particularité est de faire intervenir 2 protons et 2 électrons. C'est d'ailleurs la nature de ces protons et de ces électrons qui a permis la classification en sous-familles de ces cytochromes P-450. Roberts et al. ont montré en 2002 qu'ils pouvaient se répartir en quatre classes (**Figure 36**).

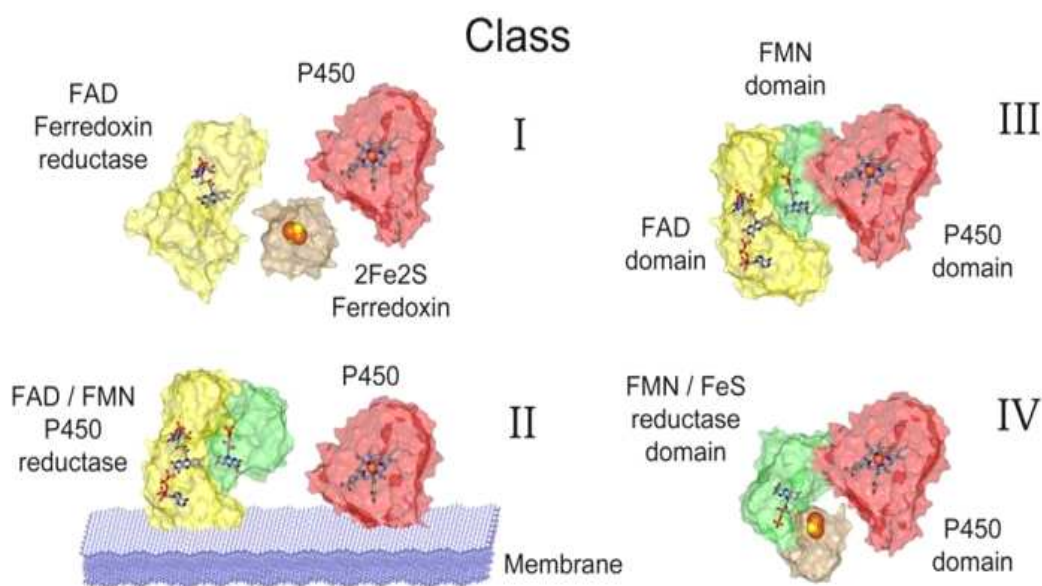


Figure 36 Classification des cytochromes P-450 (Schéma de Steve Chapman, [www.chem.ed.ac.uk/chapman](http://www.chem.ed.ac.uk/chapman))

Les cytochromes présents dans les mitochondries et dans la plupart des bactéries appartiennent à la classe I. Dans cette classe, la chaîne des transporteurs d'électrons est constituée de deux protéines, une réductase à flavine (FAD) contenant un cluster [2Fe-2S] et une oxygénase. Les cytochromes de la classe II sont présents chez les cellules eucaryotes. Ce sont des cytochromes microsomaux, identifiés dans les membranes du réticulum endoplasmique. Ces cytochromes contiennent trois protéines : une réductase à flavines (FAD-FMN), une ferredoxine qui possède un centre [2Fe-2S] et une oxygénase terminale. La structure des cytochromes de classe III ne diffère de celle de la classe II que par la présence d'une liaison peptidique,

nous retrouvons ces cytochromes chez certaines bactéries (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*). La classe IV a été créée après la découverte récente d'une nouvelle structure de cytochrome chez les bactéries du genre *Rhodococcus* qui sont capables de dégrader un large éventail de xénobiotiques (Roberts et al., 2002) (**Figure 37**).

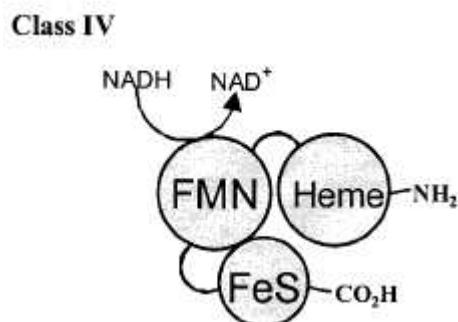


Figure 37 Fonctionnement des cytochromes de la classe IV (Roberts et al., 2002)

La réaction catalysée par les cytochromes P450 peut se schématiser par un cycle réactionnel montrant les différents états redox pris successivement par la protéine (**Figure 38**).

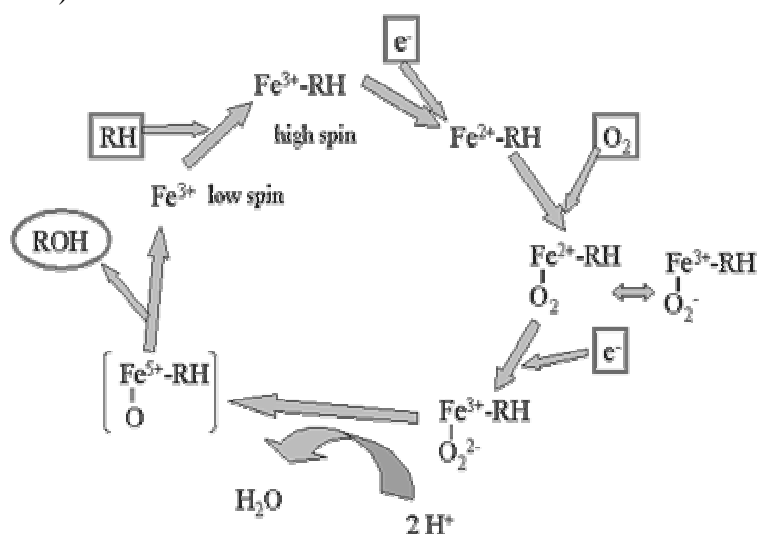


Figure 38 Cycle réactionnel du cytochrome P-450 (RH : substrat hydrophobe)

Le fer présent initialement dans la partie hémique du cytochrome est le fer(III), dans un état « low spin ». Lorsque le substrat RH vient se fixer au fer, cela provoque un changement de spin qui passe dans l'état « high spin ». Le potentiel d'oxydoréduction devient alors suffisamment bas pour provoquer la réduction de

l'enzyme, et le fer sous forme fer(II) peut dès lors réagir avec l'oxygène moléculaire. Un complexe oxygéné est ainsi formé. Il subit une nouvelle réduction qui constitue vraisemblablement le point de départ de l'activité catalytique de l'enzyme en activant l'oxygène. Le mécanisme qui a été proposé pour la suite du cycle est à confirmer mais il semblerait qu'après une forme peroxo, il y ait apport de 2 protons et formation d'un radical  $\pi$ -cation de la porphyrine avec le fer dans un état de valence élevé (+V). Le produit hydroxylé ROH est alors libéré et l'enzyme retrouve son état initial.

### III.3.3 Les dioxygénases

Les dioxygénases ont un rôle important dans l'initiation de la biodégradation d'un grand nombre de composés aromatiques chlorés et azotés. Elles catalysent la réaction d'incorporation des deux atomes d'oxygène d'une même molécule de dioxygène de l'air sur un substrat. Selon le type de réaction qu'elles catalysent, ces enzymes peuvent se classer en deux catégories (Bertini et al., 1996) : les enzymes de type I qui ont besoin du cofacteur NAD(P)H et qui hydroxylent les substrats aromatiques, et les enzymes de type II qui n'ont pas besoin de cofacteur et qui clivent les noyaux aromatiques.

La **catégorie de type I** regroupe les dioxygénases qui intègrent 2 groupements hydroxyle sur un cycle aromatique en position ortho l'un de l'autre formant ainsi un diol. Elles sont également nommées dioxygénases hydroxylantes et sont réparties en trois groupes distincts d'un point de vue structural :

- Dans le groupe 1, le système comprend 4 sous-unités : une flavoprotéine réductase et une ferredoxine [2Fe-2S] qui assurent à elles deux le transfert d'électrons, et deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  plus connues sous le nom de protéine fer-soufre (ISP) qui forme la partie hydroxylase catalytique. Les dioxygénases du groupe 1 sont représentées par la benzène dioxygénase, la toluène dioxygénase, la biphényle dioxygénase et la naphthalène dioxygénase. Elles peuvent également attaquer des hydrocarbures aromatiques polycycliques plus importants comme le phénanthrène et l'anthracène. Hormis pour le benzène qui n'est pas substitué, la dihydroxylation a toujours lieu sur le carbone adjacent au carbone portant un substituant. La **Figure 39** montre le mécanisme de dihydroxylation d'une molécule de toluène par la toluène dioxygénase (Rd : réductase ; Fd : ferredoxine ; ISP : protéine fer-soufre contenant les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ ).



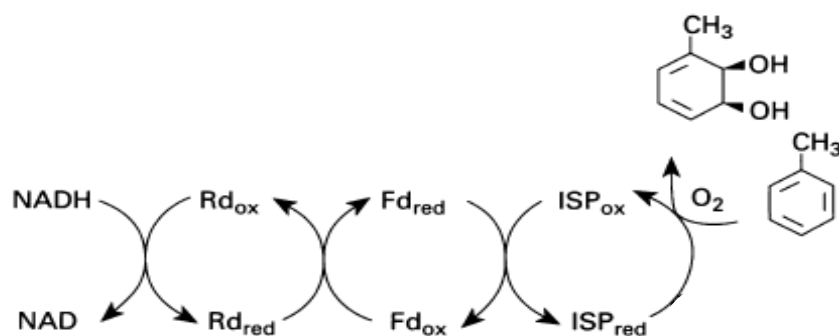


Figure 39 Réaction de dihydroxylation du toluène catalysée par une dioxygénase de type I groupe 1 (adapté de Wackett, 1995)

◆ Dans le groupe 2, les dioxygénases sont constituées de 3 sous-unités : la sous-unité 1 assure le transfert d'électrons entre le NAD(P)H et l'hydroxylase et les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  forment la partie hydroxylase catalytique. Le groupe 2 est représenté par les benzoate et les toluate dioxygénases. Au cours de la réaction un groupe hydroxyle se positionne sur le carbone portant le groupe carboxylate, sulphonate, nitro ou chlore et l'autre groupe hydroxyle va sur le carbone adjacent ; ainsi les positions 1 et 2 sont hydroxylées. La **Figure 40** présente la dihydroxylation des benzoates substitués par ces dioxygénases.

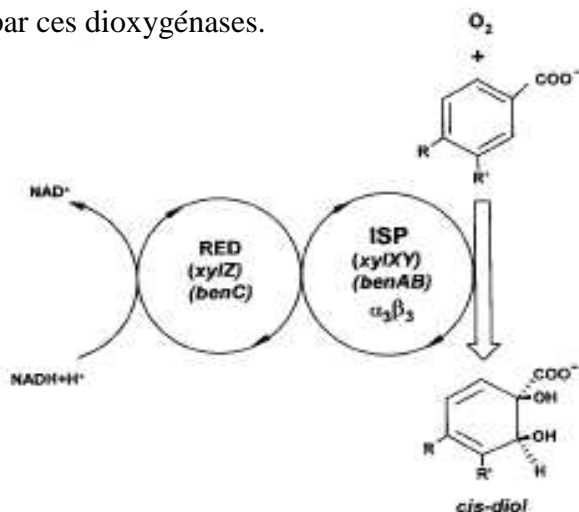
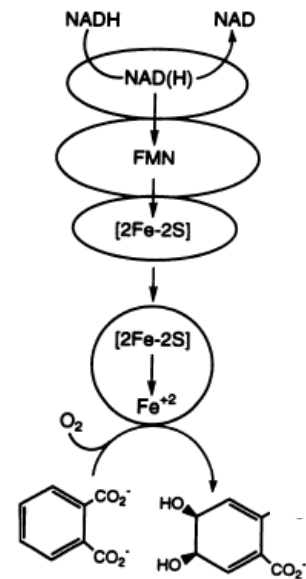


Figure 40 Réaction de dihydroxylation des benzoates substitués (Ge et Eltis, 2003)

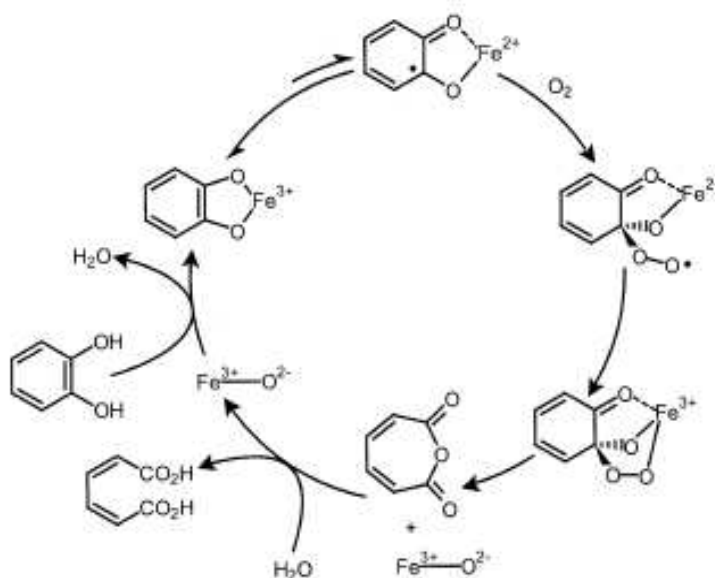
◆ Dans le groupe 3, les dioxygénases ne contiennent que deux sous-unités : l'une est chargée du transfert d'électron et l'autre, la sous-unité  $\alpha$ , assure la fonction d'hydroxylase. Le groupe 3 est représenté par les phtalate dioxygénases. L'enzyme hydroxyle le cycle phtalate en positions 4 et 5 comme le montre la **Figure 41**.

Figure 41 Dihydroxylation du phtalate par la phtalate dioxygénase (Gassner et al., 1995)

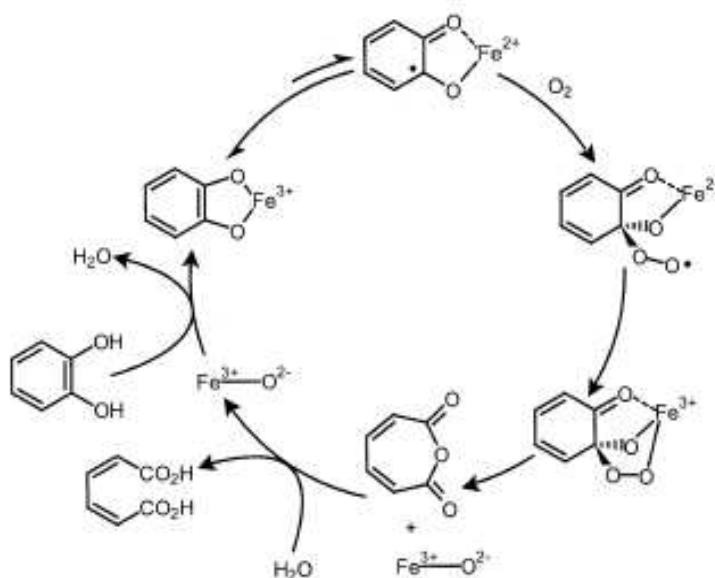


La **catégorie de type II** regroupe les dioxygénases qui ouvrent les cycles aromatiques dihydroxylés suite à une dihydroxylation en ortho (catéchol) ou en para (gentisate). Parmi ces deux formes, la plus commune et la plus facilement clivable est celle qui possède la structure catéchol. Les dioxygénases de type II possèdent, dans leur site actif, un atome de fer qui participe à la catalyse, mais elles ne nécessitent pas de cofacteurs au contraire des dioxygénases de type I.

- Les dioxygénases qui clivent les catéchols peuvent faire un clivage en ortho ou bien en méta.
  - les réactions de clivage en ortho sont dites intradiol et sont catalysées par les catéchol 1,2-dioxygénases (**Figure 42**) et les protocatéchuates 3,4-dioxygénases ; ces enzymes contiennent un ion ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ .



*Figure 42 Schéma  
d'action de la 1,2-  
dioxygénase sur un catéchol  
(Pascaly et al., 2001)*



- les réactions de clivage en méta sont dites extradiol et sont catalysées par les catéchol 2,3-dioxygénases (**Figure 43**), les protocatéchuates 3,4-dioxygénases et les protocatéchuates 4,5-dioxygénases; ces enzymes contiennent un ion ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ .

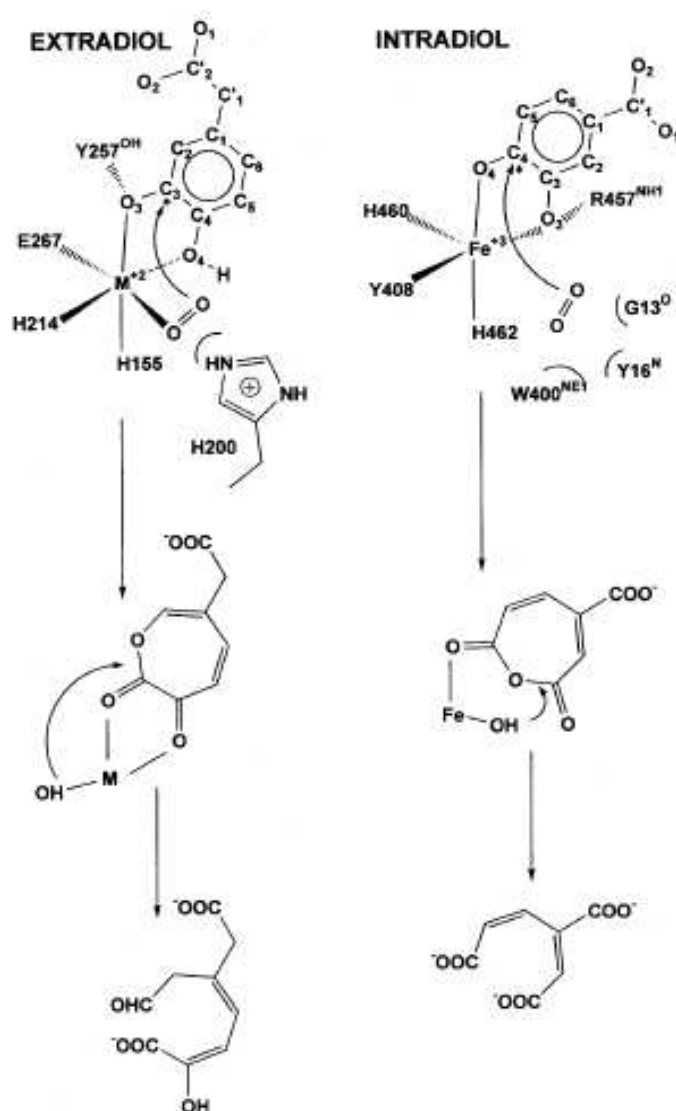


Figure 43 Mécanisme de clivage d'un catéchol par la 2,3-dioxygénase et par la 1,2-dioxygénase (Vetting et Ohlendorf, 2000)

- Le clivage des composés aromatiques dihydroxylés en para est mené par les gentisate dioxygénases. Ces enzymes contiennent un ion ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ . La **Figure**

44 présente la dégradation du 3-hydroxybenzoate par deux bactéries : *P. acidovorans* et *P. testosteroni* qui possèdent toutes deux la gentisate 1,2-dioxygénase. *P. testosteroni* peut également dégrader le 3-hydroxybenzoate grâce à une autre enzyme qu'elle possède, la protocatechuate 4,5-dioxygénase.

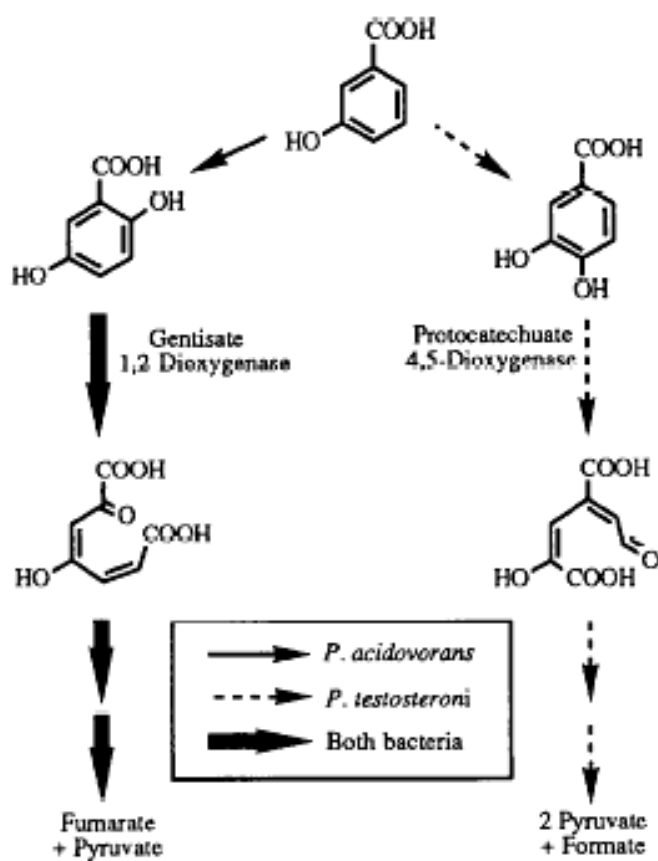


Figure 44 Voies de dégradation du 3-hydroxybenzoate par *P. acidovorans* et *P. testosteroni* et enzymes mises en jeu (Harpel et Lipscomb, 1990)

## IV IMMOBILISATION DES CELLULES

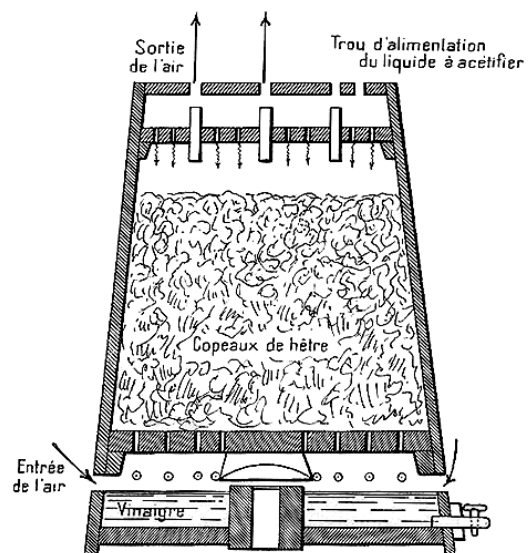
### IV.1 Définition

Les procédés d'immobilisation des microorganismes sont des techniques biotechnologiques de plus en plus développées notamment en vue du traitement des eaux ou pour l'industrie car les microorganismes sont ainsi plus faciles à manipuler. Ces techniques d'immobilisation miment la nature où les bactéries sont rarement en suspension et forment au contraire des agrégats, des floccs, des biofilms qui sont des structures qui les protègent.

### IV.2 Généralités

La technique des cellules immobilisées est une technique ancienne, pour illustration, elle est utilisée traditionnellement par les allemands dans la fabrication du vinaigre où des bactéries acétiques sont immobilisées sur des copeaux de hêtre (Figure 45).

Figure 45 Fabrication du vinaigre par immobilisation des bactéries acétiques sur copeaux de bois



L'immobilisation d'une culture active de bactéries peut par exemple apporter des avantages dans les processus de fermentation ce qui lui confère notamment un intérêt pour l'industrie agroalimentaire (production de yaourts, fromages, kéfir...). Une autre application de l'immobilisation des microorganismes est la bioremédiation.

De très nombreuses études pour la mise en place de procédés industriels ont été menées ces dernières années sur les systèmes immobilisés synthétiques ou naturels et ont mis en évidence les avantages et les inconvénients de cette technique (Tableau 10).

Avantages	Inconvénients
Haute densité cellulaire d'où bioconversion plus rapide	Possibilité de détachement des cellules du support entraînant une contamination du milieu
Protection des cellules : augmentation de leur stabilité biologique et physique	Stabilité mécanique et chimique de certains supports parfois insuffisante (décomposition par le produit, dissolution)
Facilité de récupération/de séparation	Possibilité de destruction du support par les cellules qui prolifèrent induisant la libération de ces dernières
Stimulation de la production et de la sécrétion des métabolites	Bioconversion parfois ralentie du fait d'une limitation de la diffusion
Stabilité plasmidique	Coût élevé à grande échelle
Modification possible du métabolisme	Modification possible du métabolisme
Résistance à la contamination	
Réutilisation possible du support et des cellules immobilisées	
Travail en continu	

Tableau 10 Avantages et inconvénients des techniques d'immobilisation des cellules (Junter et Jouenne, 2004)

### IV.3 Les techniques d'immobilisation

L'immobilisation des cellules peut s'effectuer selon diverses méthodes : l'adsorption ou l'attachement à un support préformé, l'inclusion dans des matrices poreuses, la rétention derrière des membranes et la floculation (**Figure 46**). Il y a également la technique de cross-linking qui consiste à attacher les cellules entre elles par des liaisons chimiques en utilisant des réactifs de type glutaraldéhyde, mais cela reste une méthode peu utilisée.

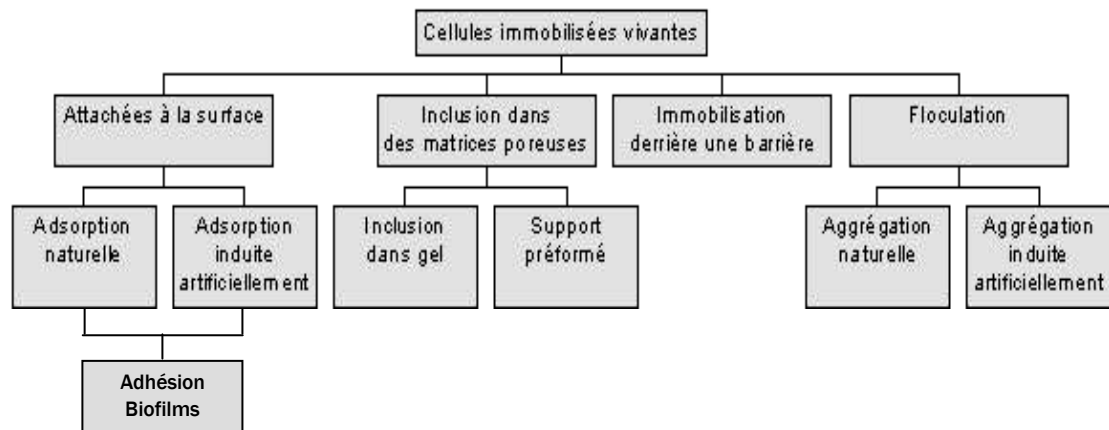


Figure 46 Classification des techniques d'immobilisation adaptée de Willaert et Baron 1996

#### IV.3.1 Adhésion à un support

Cette technique d'immobilisation (**Figure 47**) est basée sur la facilité qu'ont les cellules à coloniser une surface solide et à s'y développer. Dans un premier temps, grâce à un phénomène de transport actif ou passif, la bactérie entre en contact avec une surface. La deuxième étape consiste en une adhésion bactérienne d'abord réversible par le biais notamment de forces électrostatiques et de Van der Waals puis de manière irréversible grâce à des liaisons covalentes avec notamment la synthèse d'exopolysaccharides. Les phénomènes d'adhésion sont régulés, d'une part, par la présence d'organelles de surface bactérienne (pili, fimbriae, curli) et d'adhésines, d'autre part, par les conditions physico-chimiques de la surface d'adhésion et les conditions physico-chimiques environnementales (pH, température,...). La troisième étape correspond à l'arrivée d'autres bactéries aboutissant à un regroupement bactérien qui constitue des micro-colonies permettant la cohésion du biofilm. La quatrième étape est une étape de maturation et de détachement. Cette phase correspond à l'organisation du biofilm dont la structure est complexe : micro-colonies de bactéries reliées entre elles par des structures filamenteuses constituant un réseau au sein duquel se développent des canaux permettant une circulation et des échanges de nutriments et d'oxygène. A la phase de maturité du biofilm, des bactéries peuvent s'en détacher pour retourner à l'état planctonique en vue de reformer un biofilm à distance caractérisant ainsi l'état dynamique du biofilm. Cette structure complexe du biofilm lui permet de résister aux agressions physico-chimiques externes (Junter et Jouenne, 2004). La **Figure 48** montre le mécanisme de formation d'un biofilm.

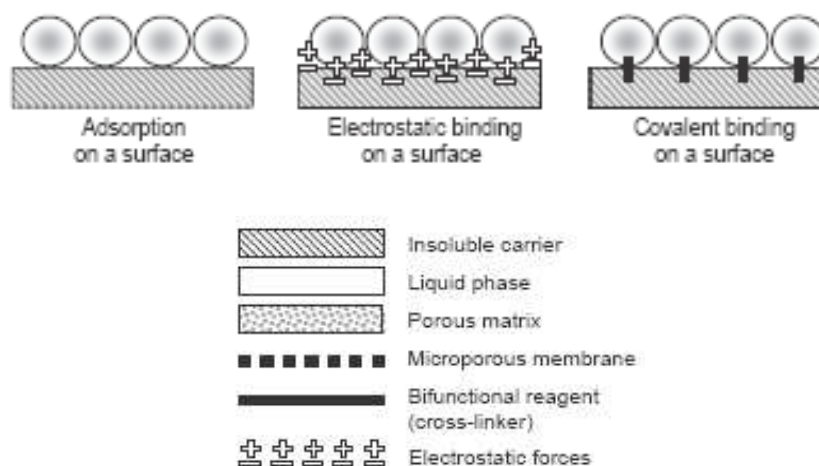


Figure 47 Immobilisation à la surface d'un support : 3 méthodes (Kourkoutas et al., 2004)

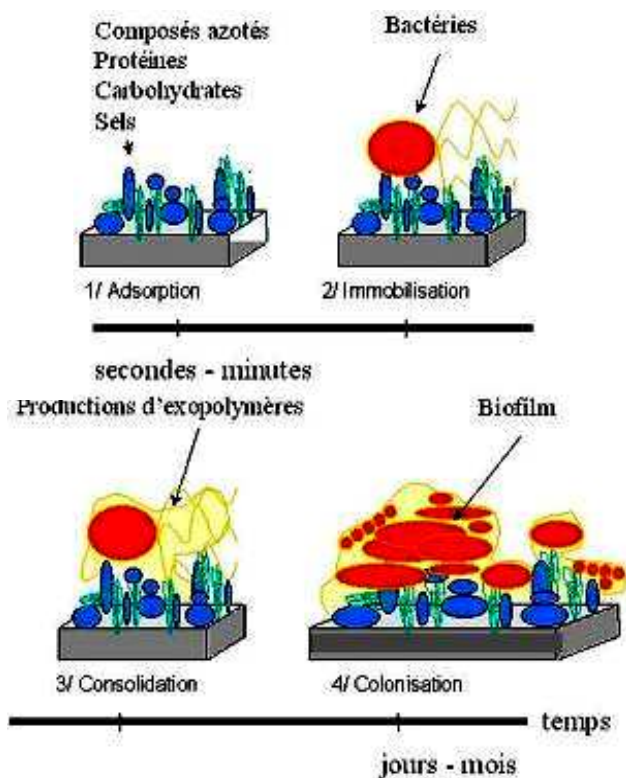


Figure 48 Formation de biofilm ([www.ifremer.fr](http://www.ifremer.fr))



Nous pouvons citer quelques exemples de supports poreux solides utilisés fréquemment : le verre, la céramique, l'acier inoxydable, le caoutchouc de silicone. Pour des supports non poreux, l'immobilisation des cellules se fait grâce à la formation naturelle d'un biofilm ce qui signifie que l'utilisation de ce type de support n'est pas propice à tous les microorganismes. Groboillot et al. (1994) ont par ailleurs montré que le biofilm peut se séparer du support lorsque les interactions sont faibles.

La diffusion du substrat et par conséquent sa biodisponibilité posent moins de difficultés dans le cas de l'immobilisation par adhésion sur un support que lors d'une immobilisation par inclusion dans des matrices poreuses. Autre avantage de cette méthode, les supports utilisés sont plus résistants aux forces de cisaillement et de compression produites par l'agitation dans les bioréacteurs et permettent généralement une stérilisation par la vapeur. Les deux principaux aspects négatifs de cette méthode par rapport à l'inclusion dans des matrices poreuses sont la moindre densité cellulaire et le problème du détachement de cellules.

### IV.3.2 Inclusion dans des matrices poreuses

Le procédé d'inclusion dans une matrice poreuse (**Figure 49**) est le procédé d'immobilisation le plus répandu, il est surtout utilisé dans l'industrie agroalimentaire.

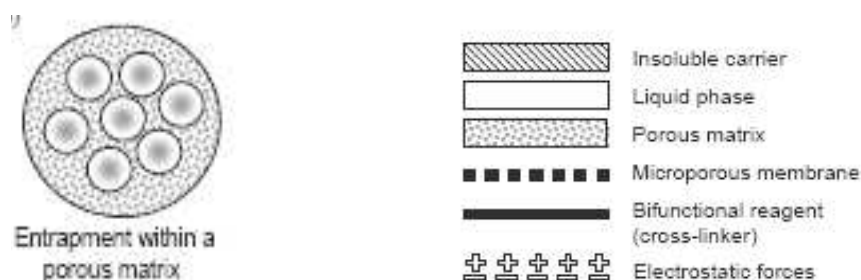


Figure 49 Inclusion dans une matrice poreuse (Kourkoutas et al., 2004)

#### IV.3.2.1 Inclusion des cellules dans un gel

Les cellules sont piégées par gélification d'une matrice polymère poreuse permettant le transport des substrats et des produits, constituée de gels de polysaccharides, de polymères naturels (polyacrilamide) ou de protéines. Lorsque l'application est pour l'alimentaire, ces gels ne doivent présenter aucune

toxicité. Les plus couramment employés sont le  $\kappa$ -carraghénane et l'alginate pour leur faible coût, leur biocompatibilité et leurs propriétés mécaniques, mais nous retrouvons également la gomme de gellan, l'agarose, la gélatine et le chitosan. Les billes de gel peuvent être obtenues selon divers procédés :

- ◆ par extrusion
- ◆ par émulsion suivie d'une étape de solidification (refroidissement ou ajout d'un gélifiant)

Dans le cas de la méthode par extrusion, une solution liquide de polymère mélangée aux microorganismes est extrudée par une seringue engendrant des gouttes sphériques qui tombent dans une solution de durcissement. Dans le cas de la méthode par émulsion, la solution aqueuse de polymère mélangé aux microorganismes est dispersée dans une phase organique donnant une émulsion eau dans huile. Les gouttes dispersées sont alors durcies soit par abaissement de la température soit par ajout d'un gélifiant. La technique de l'émulsion permet d'obtenir des billes de plus petit diamètre que par extrusion et est plus propice à la production industrielle à grande échelle. Ces procédés ont été détaillés par Groboillot et al. (1994).

#### IV.3.2.2 Inclusion des cellules dans un support préformé

La matrice d'immobilisation est ajoutée en début de fermentation. Les cellules diffusent dans les espaces libres du support puis elles s'y développent. Afin d'obtenir des densités de biomasse élevées, des supports de haute porosité sont préférables car ils permettent aux microorganismes d'accéder aux surfaces intérieures et extérieures. Le diamètre idéal des pores est celui pour lequel les pores sont assez grands pour permettre la diffusion et la croissance des microorganismes dans la matrice mais aussi suffisamment petits pour empêcher la libération des cellules en croissance. De fortes concentrations de cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* ont été obtenues par ce moyen lors de la production d'exopolysaccharides (Bergmaier et al., 2003).

#### IV.3.3 Cellules immobilisées derrière une barrière

Le maintien des cellules derrière une barrière (**Figure 50**) peut se faire soit par l'utilisation de filtres avec une membrane microporeuse, soit par le piégeage des cellules dans une microcapsule, soit par immobilisation des cellules sur une surface d'interaction entre deux liquides non miscibles (Kourkoutas et al., 2004).

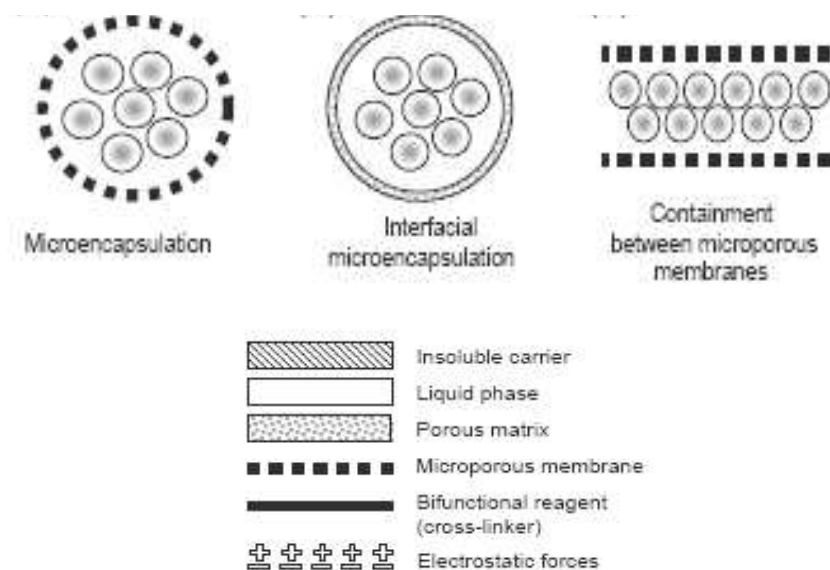


Figure 50 Cellules immobilisées derrière une barrière (Kourkoutas et al., 2004)

L'avantage de ces systèmes d'immobilisation est la quantité de biomasse qu'ils permettent de mettre en oeuvre, quantité 7 à 10 fois plus élevée qu'en batch classique (Prigent et al., 1988). En revanche, les plus gros inconvénients présentés par l'immobilisation des cellules entre des membranes microporeuses sont la limitation de transfert de masse (Lebeau et al., 1998) et la possibilité d'encrassement des membranes due à la croissance des cellules.

Cette technique d'immobilisation est limitée selon un rapport du Cemagref émis en 2004 : ses applications concernent principalement le traitement d'effluents industriels et domestiques pour des villes ne dépassant pas 200000 habitants. En effet, elle permet de traiter seulement de faibles quantités d'effluents et demande une consommation d'énergie importante pour éviter le colmatage des membranes (aération par grosses bulles). Il est par ailleurs essentiel de nettoyer régulièrement le système avec de l'eau de Javel pour lutter contre l'encrassement des membranes car ces membranes ont un coût élevé pour une durée de vie limitée à seulement 7 ans environ. L'utilisation de ces réacteurs est encore limitée en France mais la technique s'avère prometteuse car le coût des membranes diminue.

#### IV.3.4 Flocculation

Le procédé de floculation (**Figure 51**) est utilisé dans les stations d'épuration. Lorsque de l'air est injecté dans de l'eau sale, il se développe

rapidement une communauté bactérienne qui se nourrit de composés organiques. Ces microorganismes croissent, s'agglomèrent et finissent par former des « flocs bactériens » qui sédimentent dès que l'aération est arrêtée. La floculation peut effectivement être considérée comme une technique d'immobilisation puisque la taille importante des agrégats formés permet une utilisation potentielle dans des réacteurs. Cette faculté à former des agrégats est observée chez les moisissures, les champignons et les cellules végétales. Des agents de floculation artificiels peuvent également être utilisés pour améliorer l'aggrégation dans des cultures cellulaires qui ne flocculent pas naturellement.

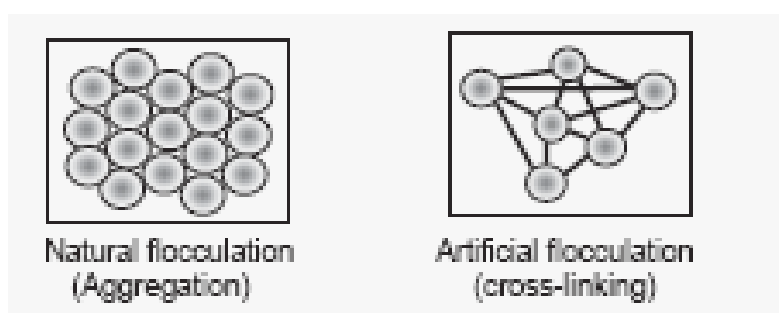


Figure 51 Cellules immobilisées par floculation (Kourkoutas et al., 2004)

#### **IV.4 Immobilisation des cellules dans un gel d'alginate**

Notre choix de technique d'immobilisation s'est porté sur l'encapsulation des bactéries dans des matrices poreuses et plus particulièrement dans un gel polymérique d'alginate. C'est une technique relativement facile à mettre en place et peu coûteuse. La littérature montre par ailleurs qu'un certain nombre d'études ont déjà été réalisées avec ce procédé et donne des résultats prometteurs.

##### **IV.4.1 L'alginate**

###### **IV.4.1.1 Généralités**

L'alginate ou les alginates sont des polysaccharides linéaires contenus dans les laminaires, genre d'algues brunes. Ces composés forment des gels durs et thermostables. Ils sont largement employés comme additifs par l'industrie agroalimentaire dans le cadre, par exemple, de la reconstruction des aliments comme

les cordons bleus, le jambon, le poisson pané et donnent une texture onctueuse aux crèmes glacées et aux sauces. Leurs propriétés diverses d'émulsifiants, de gélifiants, d'épaississants et de stabilisants en font des composés également présents dans l'industrie des cosmétiques, des peintures et des encres d'imprimerie. Leurs qualités hypoallergéniques sont intéressantes pour le domaine médical où ils trouvent diverses applications. Ils sont parfois employés pour l'encapsulation de principes actifs ou de substances biologiques fragiles (enzymes, microorganismes). Les dentistes les utilisent pour prendre des empreintes dentaires et ils entrent dans la composition de certains pansements de cicatrisation (ALGISITE M<sup>®</sup>, ALGOSTERIL<sup>®</sup>).

D'un point de vue chimique, l'alginate est un copolymère constitué de deux acides uroniques : l'acide mannuronique et l'acide guluronique qui peuvent être associés dans différentes séquences (**Figure 52**). Ces deux acides possèdent des propriétés très intéressantes qui confèrent aux algues, dont ils composent le squelette, à la fois leur force et leur flexibilité. L'acide D-mannuronique (M) a la propriété d'être mou et souple contrairement à l'acide L-guluronique (G) qui a un caractère ferme.

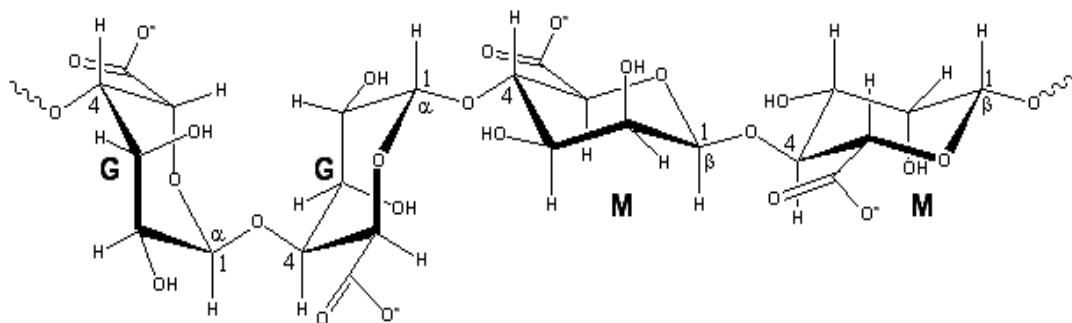


Figure 52 Copolymère d'alginate constitué de 2 unités d'acide guluronique et de 2 unités d'acide mannuronique

Les polymères isolés de différentes algues ou bien de différentes parties d'une même algue peuvent présenter différentes structures constituées du même monomère (M-M-M-M ou G-G-G-G-) ou de différents assemblages des deux monomères -M-M-G-M-G- par exemple. Il apparaît donc évident que le rapport entre le nombre d'unités G et le nombre d'unités M confère des propriétés différentes aux

alginates. Les acides mannuroniques et guluroniques peuvent également être liés par des ions divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$ .

L'alginate peut être soluble ou non selon la nature du sel associé. Ainsi, les sels de sodium ou d'autres métaux alcalins sont solubles dans l'eau alors que les sels de cations polyvalents ne le sont pas, à l'exception des sels de magnésium. C'est donc d'après ces propriétés qu'ont été développés les procédés de gélification.

#### IV.4.1.2 Inclusion des cellules dans des billes d'alginate

L'alginate le plus couramment utilisé parce qu'il est disponible commercialement est l'alginate de sodium (**Figure 53**).

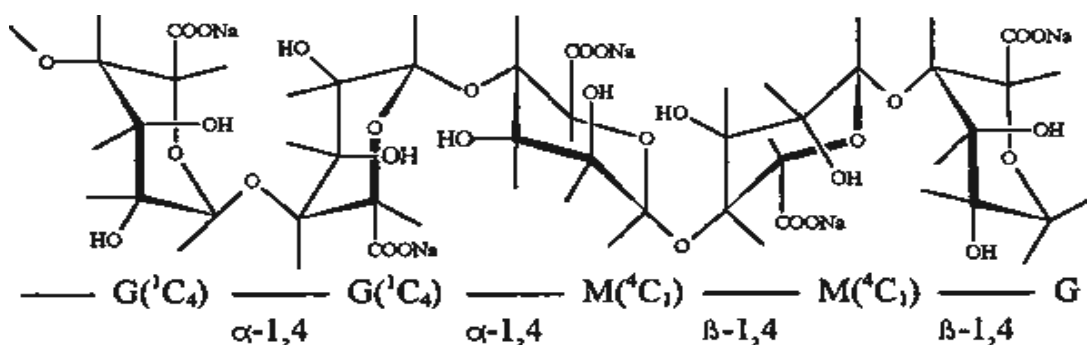


Figure 53 Alginate de sodium

L'alginate forme un gel lorsqu'il est mis en solution avec des cations di- et polychargés à l'exception de  $\text{Mg}^{2+}$ . Les cations monovalents n'induisent pas de gélification ; les cations  $\text{Ba}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$  produisent quant à eux des gels d'alginate très résistants. Le cation  $\text{Ca}^{2+}$  est le plus souvent utilisé ; lorsqu'il est mis en solution avec de l'alginate de sodium, il s'échange avec deux ions  $\text{Na}^+$  et se coordine avec les groupements hydroxyle des unités G de l'alginate (**Figure 54**). De cette manière, la résistance du gel dépend du nombre d'unités G présentes dans le polymère par rapport au nombre d'unités M (**Figure 55**).

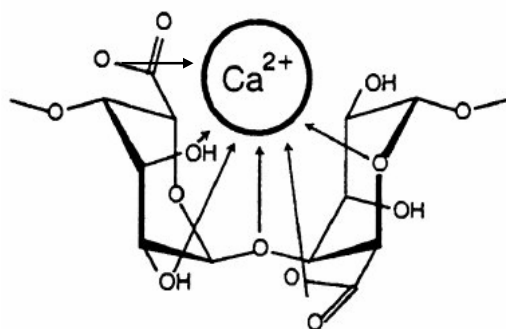


Figure 54 Coordination d'un cation  $\text{Ca}^{2+}$  avec deux unités d'acides guluronique

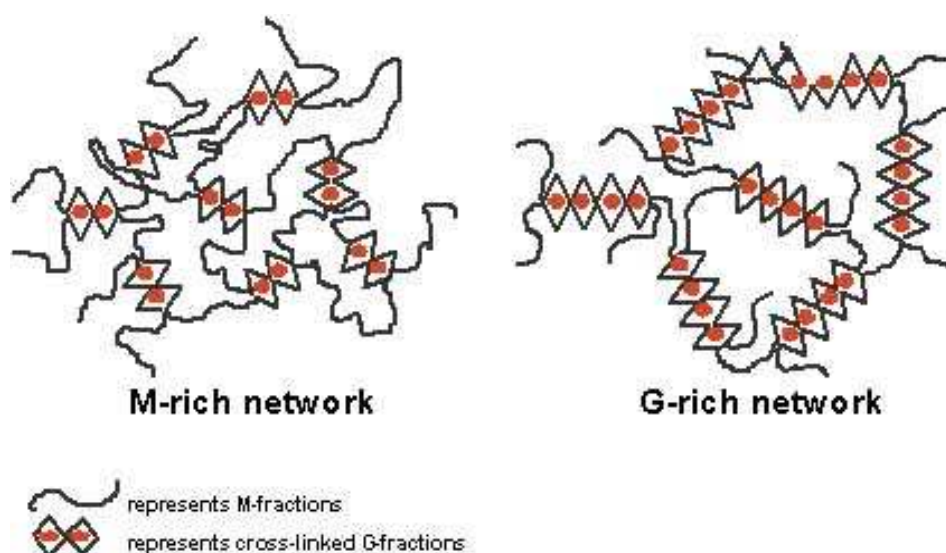


Figure 55 Mécanisme de gélification de l'alginate (site [www.genialab.de](http://www.genialab.de))

Pour encapsuler les microorganismes dans les billes d'alginate, les cellules sont mélangées à une solution d'alginate de sodium puis le mélange est versé goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium.

#### IV.4.2 Exemples d'étude de dégradation par des souches immobilisées sur gel d'alginate

De nombreuses études de dégradation employant les processus d'immobilisation sur gel d'alginate sont décrites dans la littérature. En 1998, l'équipe

japonaise de Suzuki publie des travaux sur la dégradation des hydrocarbures par la micro-algue *Prototheca zopfii* immobilisée dans des billes d'alginate de calcium ; la même année, les Indiens Manohar et Karegoudar (1998) publient leur étude sur la dégradation du naphthalène par la souche *Pseudomonas* NGK 1. Citons également les travaux de Santos et al. (2001) sur la dégradation du phénol par la souche *Trichosporon* sp. LE3 et ceux d'Abou Seoud et Maachi (2003) sur la dégradation du naphthalène par *Pseudomonas*. Nous allons détailler celle menée en 1998 par l'équipe japonaise de Mukerjee-Dhar (1998) et qui se rapproche de notre cas puisqu'il s'agit de la dégradation des PCB (Polychlorobiphényles) par la souche *Rhodococcus opacus* TSP203 immobilisée dans des billes d'alginate.

### **Dégradation de PCB par des cellules de *Rhodococcus opacus* TSP203 encapsulées dans un gel d'alginate de calcium**

Les PCB ou polychlorobiphényles sont des mélanges complexes de composés synthétisés par chloration directe d'un noyau biphényle appelés congénères. Ils ont été produits entre les années 30 et 80 pour des applications liées aux transformateurs électriques et aux appareils hydrauliques industriels. Ils possèdent des propriétés remarquables en matière d'isolation électrique, de stabilité thermique, de lubrification, et de résistance au feu. Au début des années 1980, lorsqu'il est apparu que les PCB présentaient un danger pour l'homme et pour l'environnement, l'industrie prit elle-même l'initiative d'arrêter leur production. En 1985, l'Union Européenne officialise l'arrêt de la production et de la commercialisation des PCB. Depuis 1996, une nouvelle ligne de conduite a été adoptée et vise à l'élimination progressive de ces PCB avant 2010. Leur élimination doit être contrôlée et garantie par des entreprises agréées par les autorités.

Peu de micro-organismes sont capables de dégrader les PCB. La bactérie *Rhodococcus opacus* TSP203 s'attaque à une large gamme de PCB et jusqu'à des concentrations importantes (150 µg/mL de Kaneclor 300)<sup>1</sup> lorsqu'elle est placée dans des conditions aérobies. Considérant le potentiel d'utilisation de cette souche soit dans des réacteurs, soit directement sur des sites contaminés, Mukerjee-Dhar et son équipe ont encapsulé les cellules dans des billes d'alginate et ont comparé la dégradation des PCB par cette souche en solution et immobilisée, à une concentration initiale en PCB de 20 µg/mL. La dégradation du Kaneclor 300 et du

---

<sup>1</sup> Kaneclor 300 : PCB contenant 42% de chlore



Kaneclor 400<sup>1</sup> par les bactéries en suspension ou immobilisées présentent des taux similaires : 81 % pour le Kaneclor 300 dans les deux cas (cellules en suspension et cellules immobilisées), quant au Kaneclor 400, 55% pour les cellules libres et 54% pour les cellules immobilisées. En revanche, la dégradation du Kaneclor 500<sup>2</sup> est meilleure lorsque les cellules sont en suspension (28%) que lorsqu'elles sont immobilisées (22%). D'un point de vue qualitatif, la dégradation des différents congénères présents dans le Kaneclor 300 et dans le Kaneclor 400 est similaire pour les deux systèmes. Dans le cas du Kaneclor 500, la dégradation des trichlorobiphényles et des tétrachlorobiphényles est identique pour les deux systèmes mais la dégradation des pentachlorobiphényles est supérieure dans le cas des cellules en suspension.

Le recyclage des cellules immobilisées et des cellules en suspension a également été étudié (**Figure 56**).

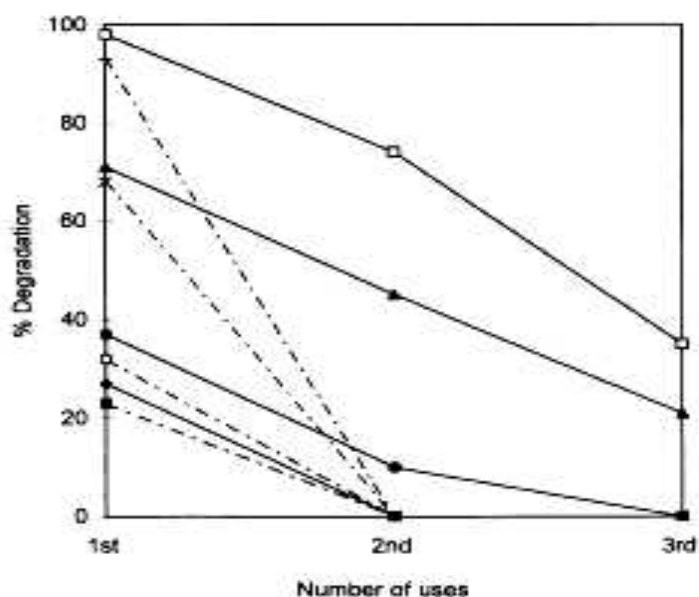


Figure 56 Recyclage des cellules de *Rhodococcus opacus* TSP203 immobilisées et en suspension pour la dégradation de 100 µg/L de Kaneclor 300. Pourcentage de dégradation du dichlorobiphényle (□), du trichlorobiphényle (▲), du tétrachlorobiphényle (●) et du pentachlorobiphényle (◆) par les cellules immobilisées ; pourcentage de dégradation du dichlorobiphényle (+), du trichlorobiphényle (×), du tétrachlorobiphényle (○) et du pentachlorobiphényle (■) par les cellules libres

<sup>1</sup> Kaneclor 400 : PCB contenant 48% de chlore

<sup>2</sup> Kaneclor 500 : PCB contenant 54% de chlore

Entre chaque cycle, les cellules sont incubées dans un milieu de réactivation pour restaurer leur biodégradabilité ; l'ajout de calcium est essentiel pour maintenir la stabilité du gel d'alginate. La **Figure 56** montre que les cellules en suspension ne peuvent être utilisées qu'une seule fois alors que les cellules immobilisées peuvent être réutilisées trois fois avec, toutefois, une forte diminution de leur efficacité. Au bout du second cycle, la capacité des bactéries immobilisées à dégrader les dichloro-, les trichloro- et les tétrachlorobiphényles a respectivement été réduite de 25, 36 et 70%, quant aux pentachlorobiphényles, ils ne sont plus dégradés.

## V RMN *IN VIVO*

### V.1 Généralités

L'étude de l'état physiologique et du métabolisme des microorganismes peut être menée *in vivo* par la technique non invasive de RMN. Cette approche présente différents avantages répertoriés par Grivet et Delort (2008). Le premier avantage est qu'elle permet à l'utilisateur de suivre l'expérience en temps réel et de prendre des décisions sur le champ comme adapter, modifier ou améliorer le protocole. Le second avantage est que chacun des spectres acquis provient du même échantillon. Le troisième avantage important est que contrairement aux extraits cellulaires où nous perdons de l'information sur certaines molécules comme les polymères intracellulaires de type glycogène ou polyphosphates, la RMN *in vivo* réalisée sur les microorganismes entiers permet ainsi d'avoir accès à toutes ces données.

La technique de RMN *in vivo* montre en revanche certains inconvénients. Tout d'abord, les signaux sont plutôt larges (30 à 50 Hz) du fait de l'hétérogénéité de l'échantillon ; cette mauvaise résolution entraîne la perte d'informations, c'est le cas par exemple des signaux des sucres phosphate lorsqu'il s'agit de RMN du phosphore. Un deuxième inconvénient concerne la concentration en métabolites à l'intérieur de la cellule qui doit être suffisamment importante pour donner un bon rapport signal/bruit. Un troisième inconvénient est la présence d'espèces ioniques paramagnétiques au sein de la cellule – les sites actifs de certaines enzymes contiennent par exemple des ions  $Mn^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$  – qui peuvent modifier la valeur du  $T_2$  (temps de relaxation transversale). Enfin, réaliser une expérience de RMN *in vivo* signifie réunir les conditions nécessaires pour le maintien en vie des microorganismes le temps de l'expérience, qui peut parfois durer plusieurs jours.

### V.2 Mise en place d'une expérience de RMN *in vivo*

Le dispositif requis pour réaliser une expérience de RMN *in vivo* et donc maintenir les cellules dans des conditions physiologiques normales peut être de deux types : soit le système permet d'apporter de l' $O_2$  ou du  $CO_2$  aux cellules (respectivement aérobies ou anaérobies), soit le système permet la circulation d'un

milieu liquide entre le tube placé dans la sonde et l'extérieur, dans ce cas, le système est dit perfusé (Grivet et Delort, 2008).

## V.2.1 Systèmes non perfusés

### V.2.1.1 Système pour des cellules anaérobies

Travailler avec des microorganismes anaérobies, et plus particulièrement strictement anaérobies, est généralement délicat mais pour les études de RMN *in vivo*, cela présente un avantage. En effet, les cellules sont entassées dans le tube RMN et sont donc déjà dans des conditions de forte anaérobiose. Il suffit ensuite de travailler sous atmosphère de CO<sub>2</sub> et de fermer hermétiquement le tube (**Figure 57**).

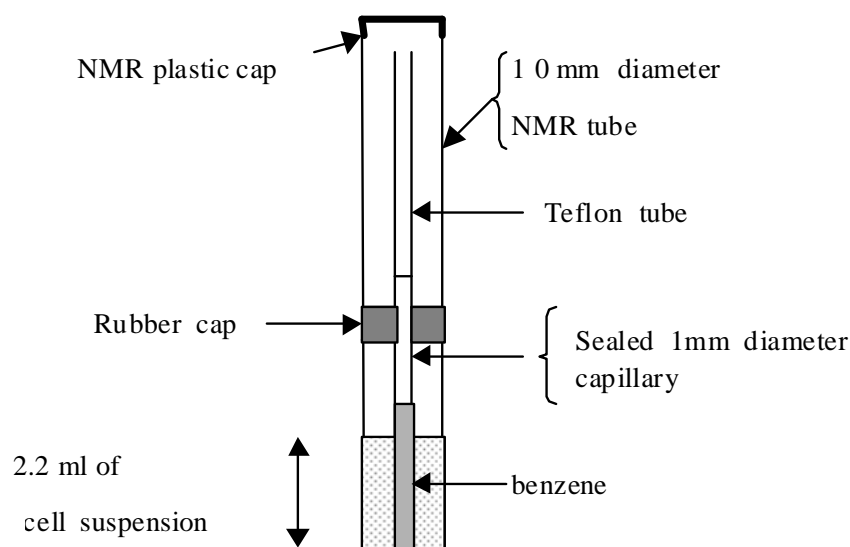
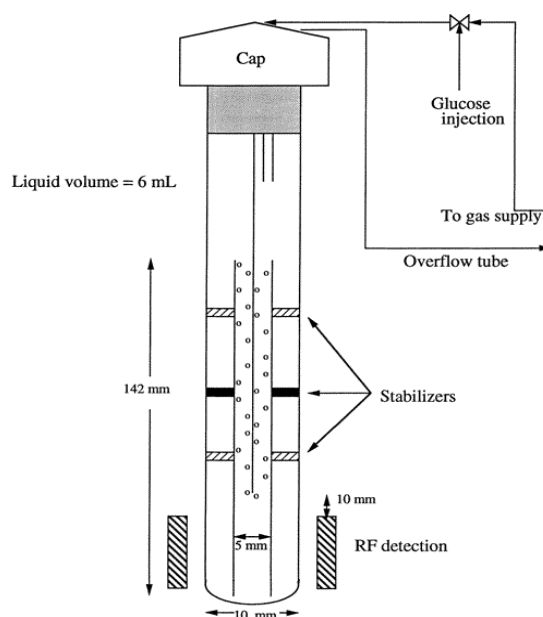


Figure 57 Système utilisé pour faire une étude en RMN <sup>13</sup>C de la bactérie *Fibrobacter succinogenes* (Grivet et Delort, 2008)

### V.2.1.2 Système avec des cellules aérobies

Il est plus difficile de travailler en aérobiose car un système d'alimentation continue en O<sub>2</sub> est nécessaire. Le dioxygène injecté peut alors perturber l'analyse RMN : d'une part, par la perte d'homogénéité du champ magnétique causée par la présence de bulles et d'autre part, parce que l'O<sub>2</sub> est une espèce paramagnétique (**Figure 58**).

Figure 58 Système mis en place pour une étude RMN en condition aérobie (Grivet et Delort, 2008)



### V.2.1.3 Les bioréacteurs

Le manque de sensibilité de la RMN demande de travailler avec des concentrations en cellules importantes afin d'éviter d'avoir des temps d'analyse trop longs. Cependant, centrifuger et concentrer les cellules peut parfois entraîner des modifications physiologiques. Un réacteur cyclone avec une membrane permettant aux cellules de croître dans l'aimant est une solution mise au point par Hartbrich et al. (2000) et par Gonzalez et al. (2000) pour pallier ce problème (**Figure 59**).

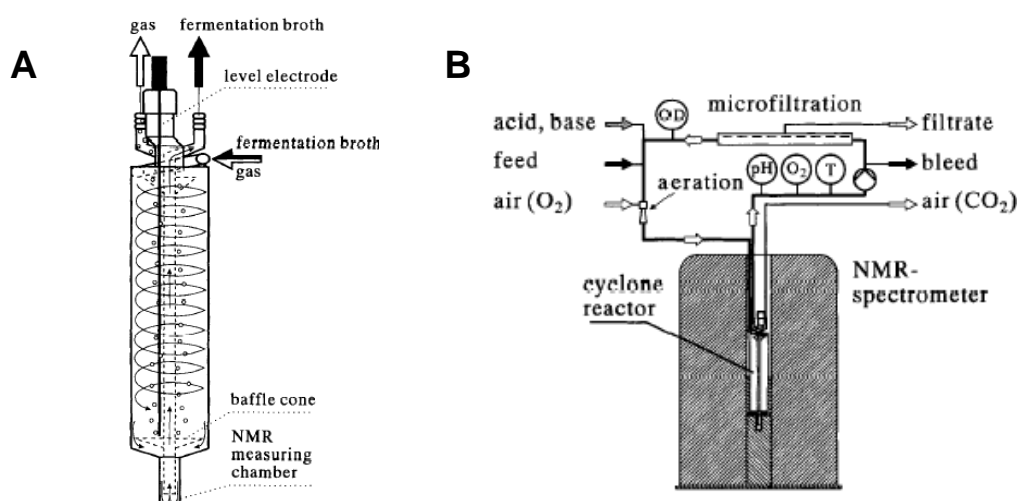


Figure 59 Réacteur cyclone (A) et son insertion dans le spectromètre RMN (B) (Grivet et Delort, 2008)

### V.2.2 Système perfusé

La circulation d'un milieu physiologique dont le pH et l'apport en gaz ( $O_2$  ou  $CO_2$ ) sont contrôlés permet aux microorganismes de survivre plusieurs jours à l'intérieur de l'aimant (**Figure 60**). Ce système présente la possibilité de modifier éventuellement la composition du milieu circulant sans arrêter l'expérience. C'est en revanche un système délicat à mettre en place puisque les débits doivent être réglés minutieusement pour éviter tout incident de débordement à l'intérieur de l'aimant.

Si la circulation des cellules avec le milieu n'est pas souhaitée, les cellules peuvent être immobilisées sur une matrice solide et ainsi être confinées dans le tube placé dans la sonde RMN. Différents types de support d'immobilisation peuvent être utilisés, parmi eux les gels d'agarose, les billes d'alginate et les gels de silice.

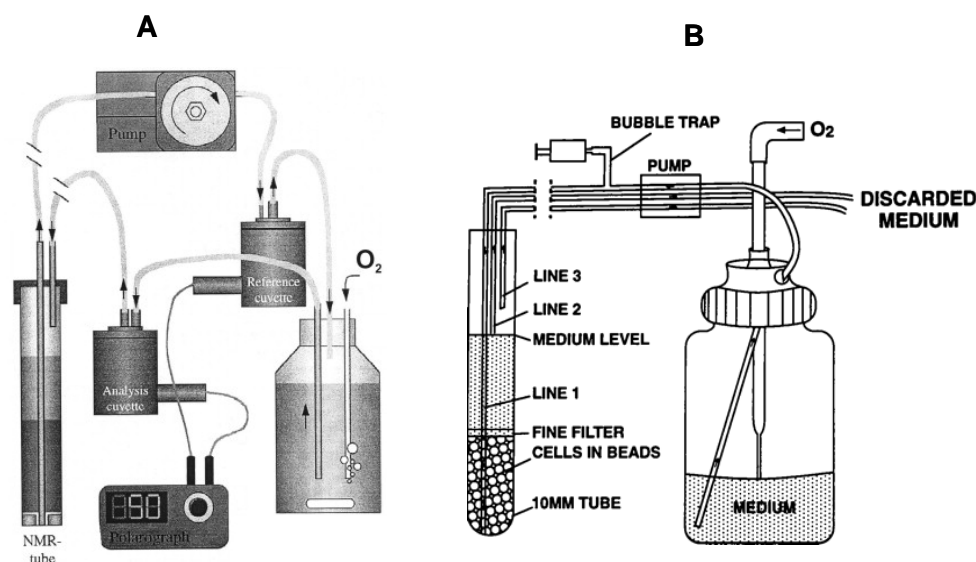


Figure 60 Systèmes de perfusion utilisés pour l'étude de cellules d'*Aspergillus niger* encapsulées dans des billes d'alginate (A) et d'*Escherichia coli* encapsulées dans des billes d'agarose (B) (Grivet et Delort, 2008)

### V.3 RMN du $^{31}P$

Le  $^{31}P$  qui a une forte abondance (100%) est donc généralement facilement observable en RMN.

### V.3.1 Paramètres détectables par RMN $^{31}\text{P}$ *in vivo*

La RMN  $^{31}\text{P}$  permet de voir les métabolites mobiles et abondants et de mesurer le pH intracellulaire. Le **Tableau 11** rassemble les déplacements chimiques des métabolites phosphorylés détectables par RMN  $^{31}\text{P}$ .

Métabolites	Déplacement chimique (ppm)
Fructose-1,6-bisphosphate	4,47 ( $\text{P}_1$ ) et 4,30 ( $\text{P}_6$ )
$\alpha$ -G6P	4,91
$\beta$ -G6P	4,91
6-phosphogluconate	4,75
Glycéraldéhyde-3-P	4,71
Glycérol-1-P	4,69
NAc- $\beta$ -glucosamine-6-P	4,62
NAc- $\alpha$ -glucosamine-6-P	4,6
3-Phosphoglycérate	4,51
Glycérol-2P	4,31
AMP (adénosine monophosphate)	4,00
2-Phosphoglycérate	3,91
Ribose-5-P	3,86
Fructose-6-phosphate	3,74
phosphoryléthanolamine	3,44
P-chol	3,28
2,3 Diphospho-glycérate	3,21
Pi	2,65
NAc-galactosamine-1-P	2,35
NAc-glucosamine-1-P	2,2
Tyrosine-O-P	0,8
Phosphoénolpyruvate	- 0,83
$\gamma$ - ATP	- 5,58
$\beta$ - ADP	-6,73
$\alpha$ - ADP	- 10,21
$\alpha$ - ATP	- 10,32
NAD	-10,62
$\alpha$ - UDPG	- 11,19
$\beta$ - UDPG	- 12,65
$\beta$ - ATP	- 19,33
polyphosphates	-22,50

Tableau 11 Déplacements chimiques de métabolites phosphorylés détectables par RMN du  $^{31}\text{P}$  – valeurs données pour un pH neutre (d'après Fan, 1996)

Le déplacement chimique du phosphate inorganique Pi permet d'accéder à la valeur du pH intracellulaire. Entre pH = 2,1 et 7,2, le Pi existe sous la forme monovalente et entre pH = 7,2 et 12,7, il existe sous la forme divalente (**Figure 61**). Les signaux correspondant aux protons de ces deux formes ont des déplacements chimiques dont la valeur diffère de 2,3 ppm (**Figure 62**).

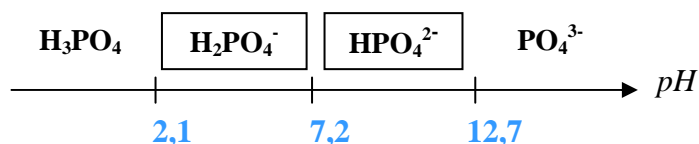


Figure 61 Formes du phosphate inorganique en fonction du pH

Lorsque le pH est proche de 7,2, les deux formes sont en équilibre. L'échange du proton étant très rapide ( $10^{10} \text{ s}^{-1}$ ), un seul signal est observé et la valeur de son déplacement chimique dépend directement des concentrations relatives en chacune des deux formes. Or, les concentrations en H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> dépendent du pH intracellulaire. Par conséquent, le déplacement chimique du signal du Pi est un indicateur du pH intracellulaire (**Figure 62**).

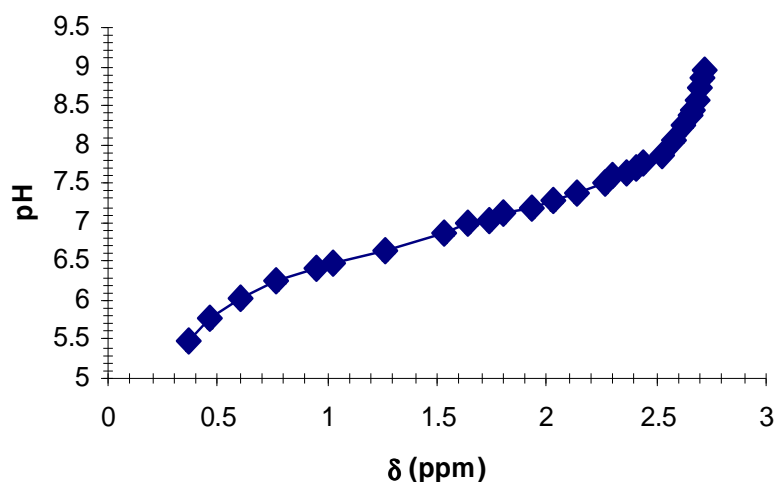


Figure 62 Variation du déplacement chimique du Pi en fonction du pH - Expérience réalisée avec *Rhodococcus rhodochrous*

### V.3.2 Exemples d'études réalisées par RMN <sup>31</sup>P *in vivo*

Dans la littérature, la RMN du phosphore a notamment été utilisée pour suivre les changements d'état énergétique des microorganismes lorsqu'ils sont



soumis à des modifications de leur environnement ou à différents stress (nature du substrat, oxygénation, lumière...). Tout d'abord, la RMN du  $^{31}\text{P}$  permet d'évaluer ces changements métaboliques en mesurant le pH et les concentrations en ATP, molécule clé du vivant. Parmi les exemples de la littérature, il y a celui de *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia stipitis* (Lohmeier-Vogel et al., 1996), des boues activées (Lemos et al., 2003), *Zymomonas mobilis* (de Graaf et al., 1999) et *Hansuela polymorpha* (Jones et Bellion, 1991). L'équipe de Gonzalez (2000) a étudié par RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo* l'influence de la réduction d'apport en oxygène chez *Saccharomyces cerevisiae*. Un autre exemple intéressant est le couplage entre RMN  $^{31}\text{P}$  et RMN  $^{15}\text{N}$  pour suivre le métabolisme de l'azote par le symbion *Alnus incanatra-Frankia* (les bactéries Frankia sont situées dans les nodules racinaires de l'aulne, elles fixent l'azote atmosphérique et le fournissent à la plante). Les nodules racinaires ont été perfusés directement dans l'aimant (Lundberg et Lundquist, 2004).

Les marqueurs pH et ATP peuvent également être évalués lors de l'exposition à des composés toxiques exogènes grâce à la RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo*. Par exemple, la modification du métabolisme énergétique par des polluants comme le pentachlorophénol chez *Sphingomonas chlorophenolica* (Lohmeier-Vogel, 2001) ou comme la tellurite chez la bactérie *Escherichia coli* (Lohmeier-Vogel et al., 2004) a été étudiée. La modification des gradients de pH en présence d'antibiotiques ionophores comme la monensine chez *Streptococcus faecalis* (Delort et al., 1989 ; Rabaste et al., 1992) et l'amphotéricine B chez *Candida albicans* (Rabaste et al., 1995) ont été suivis par RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo*. Dahan-Grobgeld et son équipe (1998) ont mené une étude intéressante au cours de laquelle *E.coli* était exposée à un agent mutagène. Les cellules ont été observées *in vivo* alors que le système réparait l'ADN endommagé. Les auteurs ont montré que dans ces conditions, les cellules maintenaient leur niveau d'ATP constant.

Enfin, les polyphosphates peuvent également servir d'indicateurs des changements environnementaux et peuvent être étudiés par RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo*. Une série de publications de l'équipe de Kjeldstad décrivent l'influence des irradiations UV (Kjeldstad et Johnsson, 1987 ; Kjeldstad et al., 1991) et des traitements hyperthermiques (Kjeldstad et Johnsson, 1989) sur le métabolisme des polyphosphates par une bactérie de la peau sensible à la lumière, *Propionibacterium acnes*. L'équipe de Packer (1987) a étudié les effets des sels sur la bactérie *Cyanobacterium synechococcus* qui vit en eau fraîche. Les polyphosphates sont également importants pour les microorganismes impliqués dans l'élimination du

phosphore dans les stations de traitement des eaux, comme le montrent Timmerman (1984) et l'équipe de Florentz (1984). L'équipe de Boswell (1999) a étudié l'effet des métaux lourds et d'autres conditions environnementales sur le métabolisme anaérobie des phosphates chez *Acinetobacter johnsonii*. Cette souche présente un potentiel pour la biorémediation des eaux contenant des métaux lourds. Pour citer d'autres travaux, Nishikawa et son équipe (2006) ont étudié par RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo* le métabolisme des polyphosphates chez l'algue *Chlamydomonas acidophila* KT-1 soumise à un stress phosphate.

Nous détaillerons ci-après l'étude concernant l'influence de la tellurite sur *E. coli* (Lohmeier-Vogel et al., 2004) ainsi que les travaux de Hesse et son équipe (2000) sur la mesure du pH intracellulaire par RMN du  $^{31}\text{P}$  chez *Aspergillus niger* ; ces deux études présentent, en effet, beaucoup d'intérêt et de similitudes avec la nôtre.

#### V.3.2.1 Etude RMN $^{31}\text{P}$ *in vivo* de la toxicité de la tellurite chez *Escherichia coli*

En 2004, l'équipe de Lohmeier-Vogel a étudié la toxicité de la tellurite<sup>1</sup> sur la bactérie *Escherichia coli* HB101 par RMN du  $^{31}\text{P}$  en suivant l'évolution au cours du temps de paramètres importants du métabolisme (pH, ATP...). La présence d'un seul signal ou de deux signaux de Pi a permis d'estimer la présence ou non d'un gradient de pH transmembranaire. Les taux d'ATP et de sucres phosphate bien résolus ont également été suivis au cours du temps. Deux types de bactéries ont été étudiées : la première souche, dite normale, contenant un plasmide pUC8 ne montrant pas de résistance à la tellurite (spectre de  $^{31}\text{P}$  RMN **Figure 63**) et la seconde souche, dite mutante, contenant le déterminant *tehAB* responsable de la résistance à la tellurite. Les expériences ont été réalisées avec la tellurite d'une part, avec la sélénite<sup>2</sup> d'autre part, ainsi qu'avec des bactéries ayant ou pas un apport en glucose.

---

<sup>1</sup> tellurite : forme oxydée du tellurium (Te), elle a pour formule  $\text{TeO}_3^{2-}$ . Elle est fortement toxique pour la plupart des microorganismes, notamment pour *Escherichia coli* dont elle épuise les réserves intracellulaires en thiols réduits

<sup>2</sup> sélénite : forme oxydée du sélénium (Se), elle a pour formule  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Le Se et le Te appartiennent au même groupe chimique. La sélénite n'est pas toxique pour *Escherichia coli*.

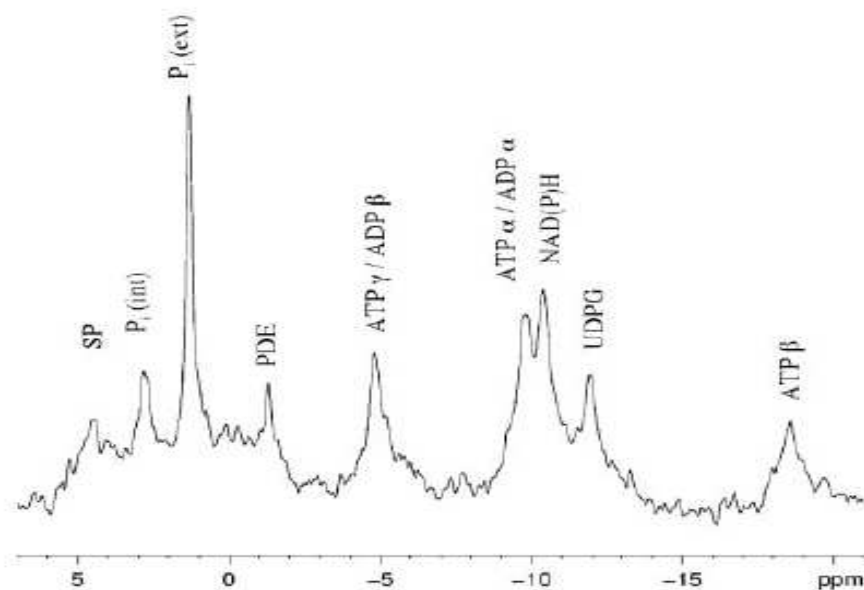


Figure 63 Spectre de RMN  $^{31}\text{P}$  (800 scans) d'*E. coli* HB101 sensible à la tellurite – spectre acquis environ 25 minutes après l'ajout de glucose – SP : sucres phosphomonoester, PDE : phosphodiester, UDPG : uridine diphosphoglucose, ATP : adénosine triphosphate,  $\text{P}_i$  : phosphate inorganique, NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Lohmeier-Vogel et al., 2004)

Le suivi par RMN  $^{31}\text{P}$  de chacune de ces expériences (**Figure 64**, **Figure 65**, **Figure 66**) a permis d'observer l'acidification significative du pH intracellulaire suite à l'ajout de tellurite ainsi que la disparition du gradient de pH transmembranaire. Le taux d'ATP a également chuté immédiatement et parallèlement au pH.

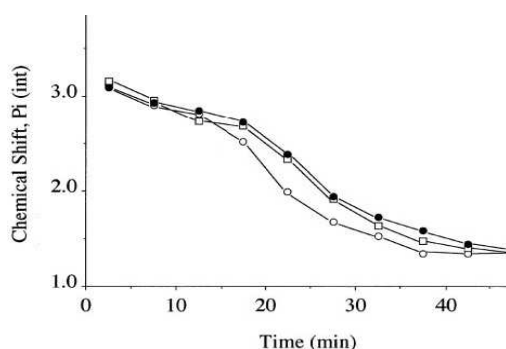


Figure 64 Evolution du déplacement chimique du signal du  $\text{P}_i$  avec le temps chez *Escherichia coli*, souche sensible. Cercles pleins, témoin ; cercles ouverts, cellules en présence de tellurite ; carrés ouverts, cellules en présence de sélénite. (Lohmeier-Vogel et al., 2004)

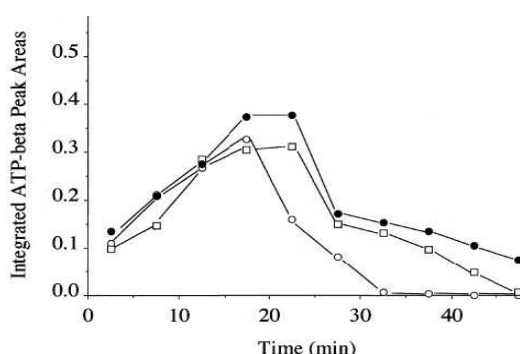


Figure 65 Evolution des aires d'intégration des signaux du  $\beta$ -ATP avec le temps chez *Escherichia coli*, souche sensible. ● : témoin ; ○ : cellules en présence de tellurite ; □ : cellules en présence de sélénite. (Lohmeier-Vogel et al., 2004)

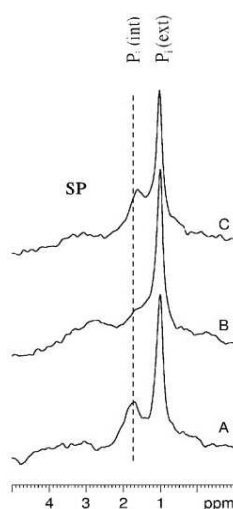


Figure 66 Région des phosphates inorganiques - témoin (A); cellules en présence de tellurite (B); cellules en présence de sélénite (C) - (Lohmeier-Vogel et al., 2004)

Les expériences réalisées avec les bactéries mutantes ont donné les mêmes spectres que les témoins prouvant qu'effectivement le déterminant *tehAB* protège bien les microorganismes du caractère toxique de la tellurite. Il a été prouvé que le gène *tehA* code pour une protéine membranaire capable de rejeter les composés ammonium quaternaire et que le gène *tehB* code pour une protéine capable de se lier à la tellurite. Les données obtenues par l'équipe de Lohmeier-Vogel vont dans ce sens et suggèrent un mécanisme par lequel la tellurite serait méthylée puis

rejetée de la cellule. Une autre observation importante a été faite d'après l'étude réalisée sur les extraits cellulaires et concerne l'absence d'effet de la tellurite sur les sucres phosphomonoesters.

### V.3.2.2 Mesure du pH intracellulaire par RMN du $^{31}\text{P}$ chez *Aspergillus niger*

La RMN du  $^{31}\text{P}$  a été utilisée par l'équipe de Hesse (2000) pour suivre les valeurs du pH cytoplasmique et vacuolaire chez *Aspergillus niger*. Ce champignon filamenteux est très utilisé dans l'industrie pour la production d'acides organiques notamment l'acide citrique et l'acide gluconique. Les conditions sous lesquelles ces biosynthèses se font ne sont pas claires mais varient suivant le pH intracellulaire : les protéines sont sensibles au pH et l'activité des enzymes clés en dépend directement. L'équipe de Hesse a donc suivi la mesure du pH intracellulaire chez *Aspergillus niger* par RMN du  $^{31}\text{P}$  en utilisant un système de perfusion.

Pour mener à bien cette étude, ces chercheurs ont dans un premier temps travaillé avec des mycelia libres placés dans le tube RMN et perfusé avec un milieu tamponné (pH = 6,7). Cependant, même avec un débit de perfusion faible (4 ml/min), les mycélia ont formé un lit compact et se sont compressés passant de 4 cm de hauteur à 2 cm. Cette compression les a placés dans des conditions d'anaérobiose si bien que les taux d'ATP et d'UDPG ont décru anormalement pendant que ceux de différents sucres phosphoesters impliqués dans le métabolisme anaérobie ont augmenté. Quant au pH cytoplasmique, il a diminué de 7,7 à 6,9 en 60 minutes. Suite aux difficultés rencontrées pour mettre en œuvre ces expériences, l'équipe de Hesse a décidé d'immobiliser *Aspergillus niger* dans des billes d'alginate de calcium.

L'immobilisation des champignons a permis de travailler avec un débit de perfusion plus élevé (15 ml/min) permettant ainsi une meilleure oxygénation et a permis d'obtenir des spectres de meilleure qualité avec un rapport signal/bruit plus faible. La **Figure 67** montre les spectres obtenus sur des champignons cultivés pendant 42 heures puis perfusés avec un milieu tamponné à pH = 6,7 et contenant 25 mM de glucose. Cette figure montre des spectres similaires sur toute la durée de l'expérience c'est-à-dire 60 minutes. Un changement a cependant été observé au niveau du pic de résonance du phosphate inorganique vacuolaire : le pool de phosphate vacuolaire s'épuise (pic indétectable après 45 minutes) et empêche la détermination du pH vacuolaire. Le phosphate vacuolaire sert probablement à équilibrer les taux de phosphates dans le cytoplasme où de grandes quantités de

sucres phosphate sont formées. Après 60 minutes de perfusion, le pic du phosphate inorganique vacuolaire réapparaît mais n'atteint pas son niveau d'origine.

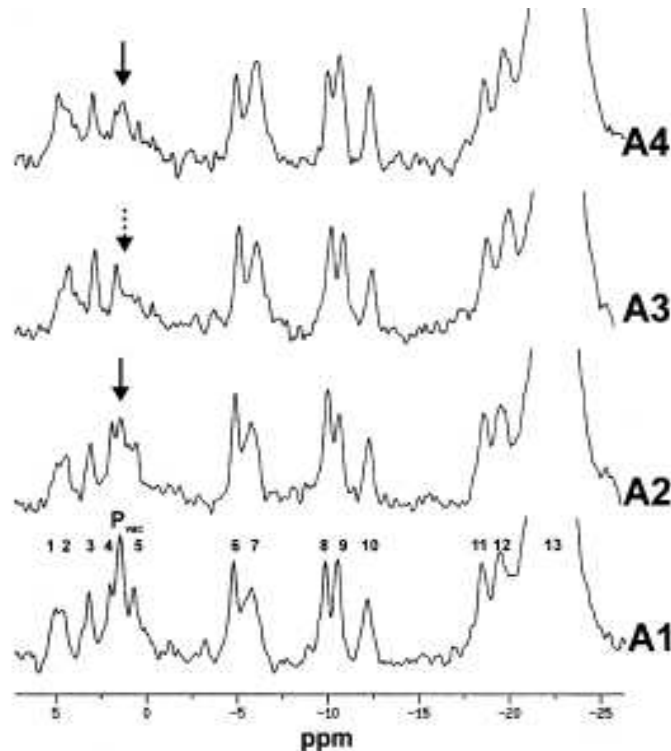


Figure 67 Spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  d'*Aspergillus niger* après 42 heures de culture et perfusés avec un tampon à pH = 6,7, saturé en oxygène et contenant 25 mM de glucose. Les spectres ont été acquis après une perfusion de 15 min (A1), de 30 min (A2), de 45 min (A3) et de 60 min (A4). ( Hesse et al., 2000)

L'immobilisation des mycélium dans des billes d'alginate est donc un système qui permet de travailler en perfusion sur des expériences de longue durée car la stabilité mécanique de l'alginate empêche tout phénomène de compression des cellules et évite ainsi l'anaérobiose.

#### V.4 RMN du $^{13}\text{C}$

L'information contenue dans un spectre du  $^{13}\text{C}$  est très importante du fait de la large dispersion des déplacements chimiques des signaux et de leur bonne résolution. L'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  est très faible (1,11%) si bien que la RMN du  $^{13}\text{C}$  combinée à l'utilisation de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$  est très utilisée pour décrire les voies métaboliques du carbone. La littérature compte un grand nombre de

travaux de recherche sur des voies métaboliques déterminées, en partie, grâce à la RMN du  $^{13}\text{C}$ . Le lecteur peut se référer, par exemple, aux revues générales de Grivet et Delort (2008), de Grivet et al. (2003), de Portais et Delort (2002) et à l'ouvrage de Barbotin et Portais (2000), mais aussi à des revues plus spécialisées sur le métabolisme des bactéries lactiques (Ramos et al., 2002) ou sur *Fibrobacter succinogenes* (Forano et al., 2008).

Nous allons maintenant détailler l'exemple de *Fibrobacter succinogenes* longuement étudié au laboratoire SEESIB.

*Fibrobacter succinogenes* est une bactérie largement présente dans le rumen surtout lorsque les ruminants ont une alimentation riche en cellulose. Ces bactéries dégradent en effet différentes formes de cellulose et présentent une grande facilité à solubiliser les polysaccharides intégrés aux parois végétales. Elles possèdent un système fibrolytique très efficace mais leur organisation et leurs caractéristiques catalytiques restent à élucider. *F. succinogenes* S85 pour qui la cellulose est le seul substrat dans la paroi végétale, l'hydrolyse en cellobiose et en glucose qui sont ensuite métabolisés par les cellules lors de la glycolyse puis fermentés en succinate, en acétate et en formiate. Il a également été montré que cette bactérie est capable de stocker de grosses quantités de glycogène intracellulaire. Pour comprendre dans le détail le métabolisme des sucres de cette bactérie, la RMN a été utilisée.

La RMN dans ce cas très précis, couplée à l'utilisation de précurseurs enrichis en  $^{13}\text{C}$  a permis d'enregistrer des spectres successifs *in vivo* sans détruire les cellules pour suivre le devenir d'un atome spécifique et d'examiner les extraits cellulaires pour caractériser les métabolites avec précision. La RMN du  $^{13}\text{C}$  a permis d'étudier le métabolisme du  $[1-^{13}\text{C}]\text{glucose}$  chez *F. succinogenes* S85 dans un premier temps, sur les cellules en repos et dans un second temps sur les extraits cellulaires. Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  *in vivo* présentés **Figure 68** ont alors mis en évidence la synthèse de glycogène marqué en position 1 comme cela était attendu mais ils ont montré également la présence de glycogène marqué en position 6. Le marquage en position 6 indique qu'il y a une réversibilité de la voie d'Embden-Meyerhof-Parnass au niveau des triose-phosphates (là où une isomérisation a lieu) suggérant la réversibilité de l'aldolase/triose phosphate isomérase comme le montre la **Figure 69**. Les auteurs ont montré que 50 % des molécules de glycogène sont synthétisées après réversion.

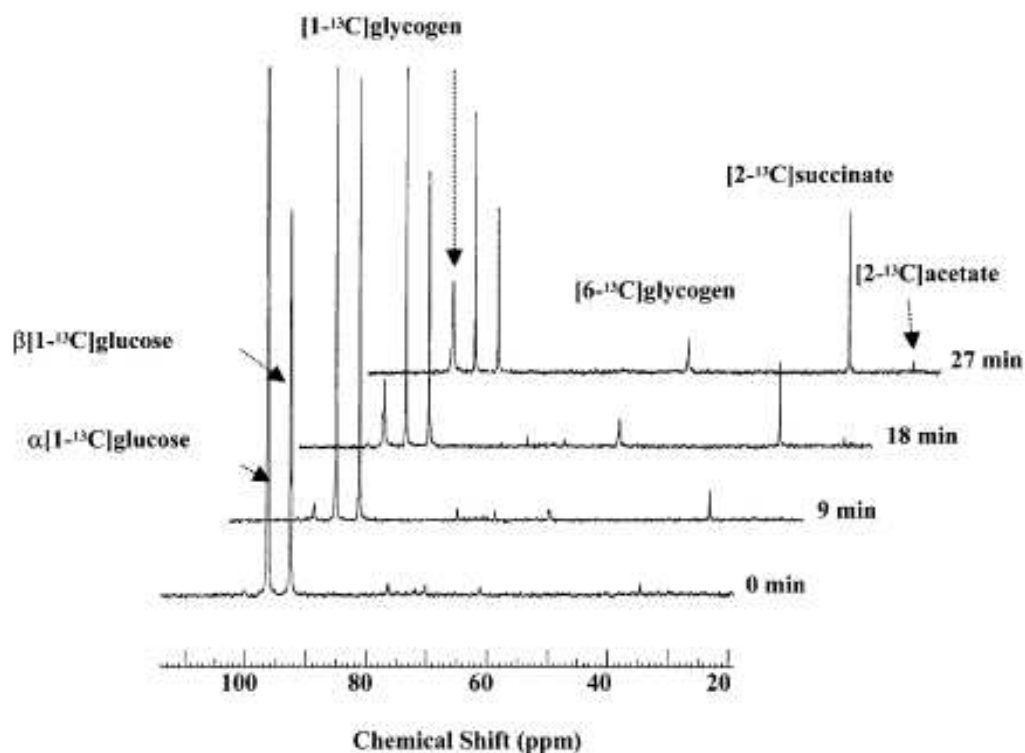


Figure 68 Spectres réalisés *in vivo* et mettant en évidence l'utilisation du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose par des cellules en repos de *F. succinogenes* S85 (Matheron et al., 1997)

Un autre cycle métabolique a été mis en évidence pour la première fois chez cette souche de bactéries : le cycle du glycogène. Ce processus consiste en la synthèse et la dégradation simultanées du glycogène, c'est pourquoi il est également nommé « cycle futile ». Un certain nombre de rôles joués par les cycles de substrats sont aujourd'hui suggérés : la génération de chaleur, la régulation des concentrations en métabolites, l'amélioration de la sensibilité pour la régulation métabolique, le rôle de mécanisme d'échange et de valve de sécurité (Portais et Delort, 2002). Les preuves de l'apparition de tels cycles ne sont pas faciles à obtenir parce qu'ils ne génèrent pas d'eux-mêmes de redistribution isotopique mais seulement une dilution isotopique.

La méthode la plus facile pour observer le cycle du glycogène est d'incuber les cellules en présence d'un substrat exogène soluble (en général, le glucose) marqué de manière différente par rapport au composé stocké. La première approche a été de développer des expériences d'« incubations séquentielles » pour



suivre simultanément par RMN  $^{13}\text{C}$  *in vivo*, la synthèse et la dégradation du glycogène. Pendant une première période d'incubation, les cellules en repos sont incubées avec du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose exogène afin que le glycogène intracellulaire devienne marqué en C1 et en C6 (marquage dû au cycle triose-phosphate). Ensuite, les cellules ont été lavées puis incubées avec du  $[2-^{13}\text{C}]$ glucose exogène. Lors de cette seconde incubation, la perte du marquage en C1 et C6 et l'incorporation du marquage en C2 et C5 peuvent être observées dans les unités de glycogène, montrant la disparition (perte de marquages) et la synthèse (apparition de nouveaux marquages) simultanées du composé. Le cycle du glycogène a été observé pour différentes souches du genre *Fibrobacter*, indiquant que ce phénomène est une caractéristique commune du genre.

Une autre approche pour évaluer le cycle du glycogène consiste à mener des analyses RMN  $^1\text{H}$  sur les produits finaux (succinate et acétate). L'utilisation de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose exogène a conduit au marquage des hexose-phosphates, du glycogène et des produits finaux alors que la dégradation du  $^{12}\text{C}$ -glycogène endogène stocké a conduit à la dilution isotopique du pool d'hexose-phosphates et par conséquent des produits glycolytiques, particulièrement du succinate qui peut être utilisé comme marqueur. Compte tenu de la symétrie de la molécule, si la totalité du succinate dérivait du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose exogène alors le pourcentage maximal de succinate marqué en C2 pouvant être obtenu serait de 25 %. La fraction de succinate marqué en C2 serait inférieure à 25 % si une partie du succinate provenait du  $^{12}\text{C}$ -glycogène endogène. Les auteurs ont montré qu'après quantification par RMN  $^1\text{H}$  du ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du succinate marqué en C2, 16 % des unités hexose-phosphates converties en succinate provenaient du glycogène non marqué, c'est-à-dire du cycle du glycogène. La dilution isotopique induite par le cycle futile du glycogène a également été estimée en analysant par RMN  $^1\text{H}$  2D le ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  d'autres métabolites bactériens, particulièrement des dérivés de sucres comme le glucose-1-phosphate, le glucose-6-phosphate, les cellodextrines et les maltodextrines (Matulova et al., 2001).

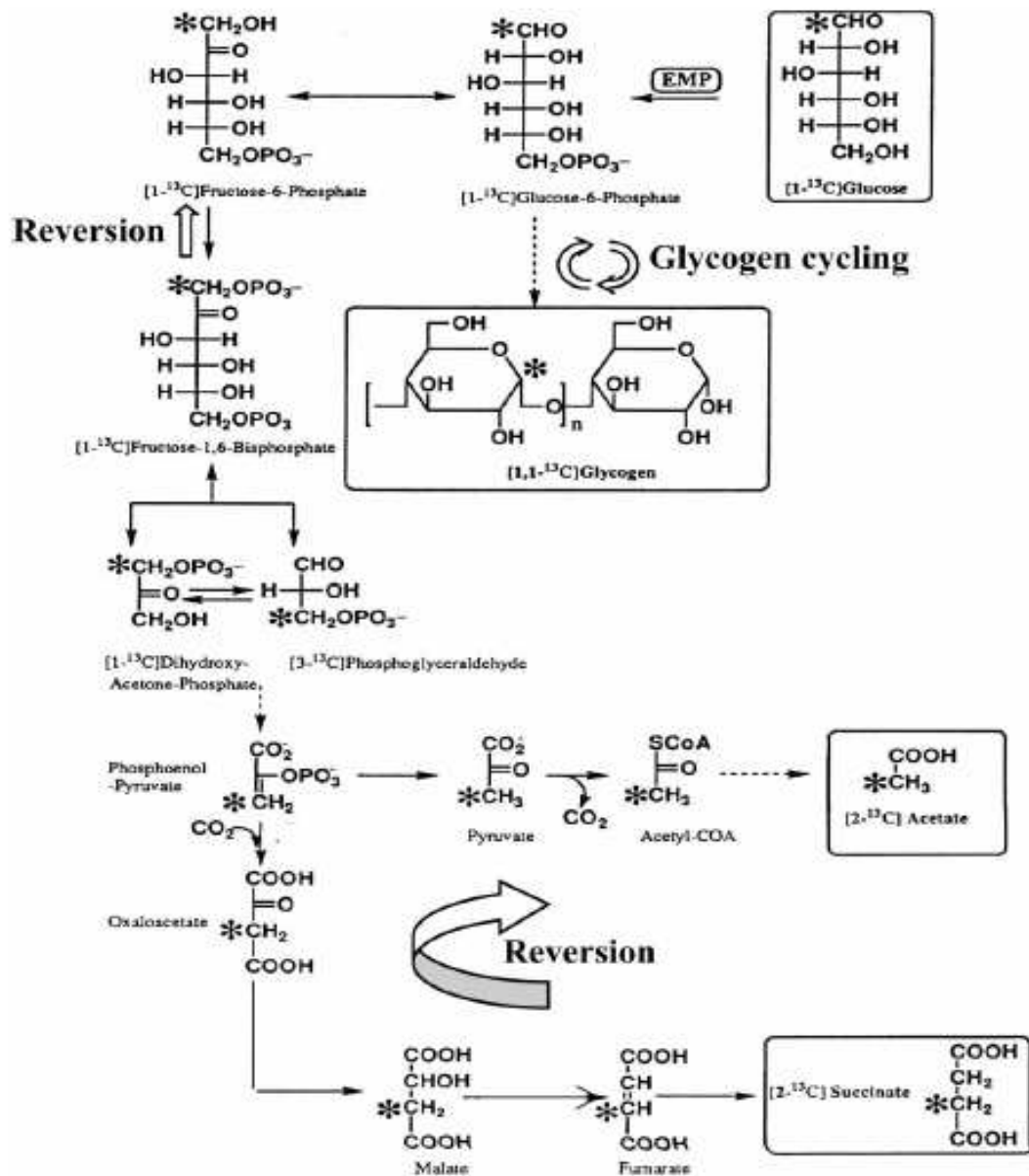


Figure 69

Voies de synthèse du succinate et de l'acétate chez *Fibrobacter succinogenes* après métabolisation de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. (Matheron et al., 1997)



## Chapitre 3

### **MATERIEL ET METHODES**

## I MISE EN PLACE DES EXPERIENCES DE BIODEGRADATION

Les expériences réalisées en batch sont menées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu et fermés par un bouchon en coton perméable à l'oxygène. Selon les expériences, les cellules sont utilisées soit en suspension, soit immobilisées dans des billes d'alginate. Les expériences menées en présence de lumière sont réalisées dans des erlenmeyers transparents, celles menées à l'obscurité, dans des erlenmeyers en verre borosilicaté ne laissant pas passer les irradiations du visible et de l'ultraviolet.

### I.1 Culture de *Rhodococcus rhodochrous*

La souche utilisée est la souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 (voir photos **Figure 70**), isolée par De Wever *et al.* (1997) à partir de boues activées de la station de récupération des eaux en aval de l'usine pharmaceutique BAYER en Belgique, une usine qui fabrique des benzothiazoles. La souche est conservée sous forme d'aliqots de 3 ml à -80°C en présence de glycérine (10%) dont le rôle est celui de cryoprotecteur.

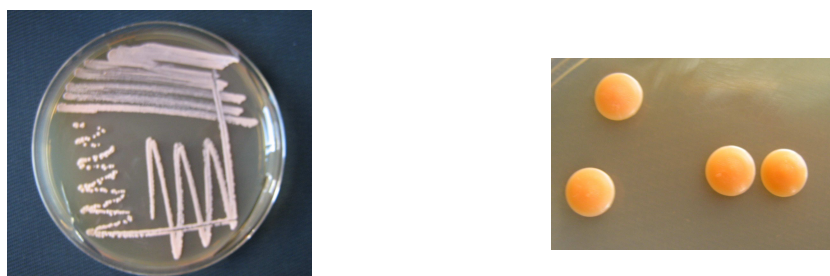


Figure 70 *Rhodococcus rhodochrous* sur milieu TS

#### Préculture

Un erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu Trypcase-Soja<sup>1</sup> (TS) est ensemencé avec un aliqot décongelé et mis à incuber 24 h à 27°C et à 200 rpm.

#### Culture

La culture se fait également dans le milieu Trypcase-Soja. Pour produire la quantité de biomasse nécessaire à un essai, 3 erlenmeyers contenant chacun 100 ml de milieu

<sup>1</sup> biotrypcase : 17g – biosoyase : 3g – NaCl : 5g – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2,5g – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2,5g

de culture TS sont ensemencés avec 2 ml de préculture (culture optimale sur 100 ml pour une meilleure oxygénation) puis agités à 200 rpm pendant 24 h à 27°C. Environ 5 g de biomasse humide sont ainsi obtenus.

### Centrifugation

La suspension cellulaire est centrifugée à 8000 g pendant 15 min, à 4°C. Le culot est d'abord lavé avec 100 ml d'une solution de NaCl à 8‰ puis est centrifugé dans les conditions citées précédemment. Un second lavage est réalisé avec 100 ml d'eau de Volvic®. Le culot est alors récupéré après centrifugation avec le milieu de l'expérience.

## I.2 Immobilisation des cellules

### Préparation de la suspension cellules-alginate

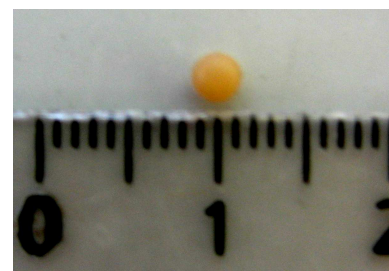
Pour un lot de billes d'alginate, 750 mg d'alginate sont placés dans 10 ml d'eau de Volvic® puis stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Le culot correspondant à 300 ml de culture et préparé comme décrit précédemment ( $\approx 5$  g de biomasse humide) est repris dans 8 ml de NaCl à 8‰ puis est ajouté à la solution d'alginate. La suspension est agitée lentement pendant 10 minutes.

### Formation des billes (Figure 71)

Un système muni d'une pompe péristaltique permet l'aspiration de cette suspension puis son passage dans une aiguille de 0,8 mm de diamètre. Des gouttes tombent ensuite d'une hauteur de 20 cm dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,2 M. Les interactions entre les unités d'acides de l'alginate et le  $\text{Ca}^{2+}$  conduisent à la polymérisation immédiate du gel. Les billes de gel ainsi formées sont ensuite placées à 4°C pendant 1h30 puis lavées deux fois avec une solution de NaCl à 8‰.



Figure 71 (en haut) Système mis en place pour la formation des billes d'alginate : à gauche, la solution contenant l'alginate dissous et les bactéries ; au centre dans le fond, la pompe péristaltique ; en premier plan à droite le flacon contenant une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,2 M – (en bas) bille d'alginate contenant les bactéries



### I.3 Préparation des milieux de dégradation

Les solutions sont toujours préparées dans l'eau minérale Volvic® car sa composition est constante.

#### Solution de 2-aminobenzothiazole (ABT)

Les expériences sont réalisées avec une concentration en xénobiotique de 0,5 mM. Une solution mère de concentration 1 mM est préparée. L'ABT se présente sous-forme de poudre blanche. Le composé étant peu soluble, la solution est agitée pendant 2 jours à l'obscurité.

#### Solution de FeNTA

Les expériences sont réalisées avec une concentration en complexe de fer de 1 mM. La solution mère à 2 mM est préparée à l'obscurité car le complexe se dissocie très rapidement à la lumière. L'acide nitrilotriacétique ou NTA est dissous dans 25 ml d'eau puis le pH est ajusté à 4 avec de la soude. Le perchlorate de fer est ajouté et la solution est complétée à 100 mL avec de l'eau. Pour confirmer la complexation, un spectre UV-visible (**Figure 72**) est enregistré entre 200 et 800 nm. A 260 nm et à pH = 4, le coefficient d'extinction molaire du complexe FeNTA est  $\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

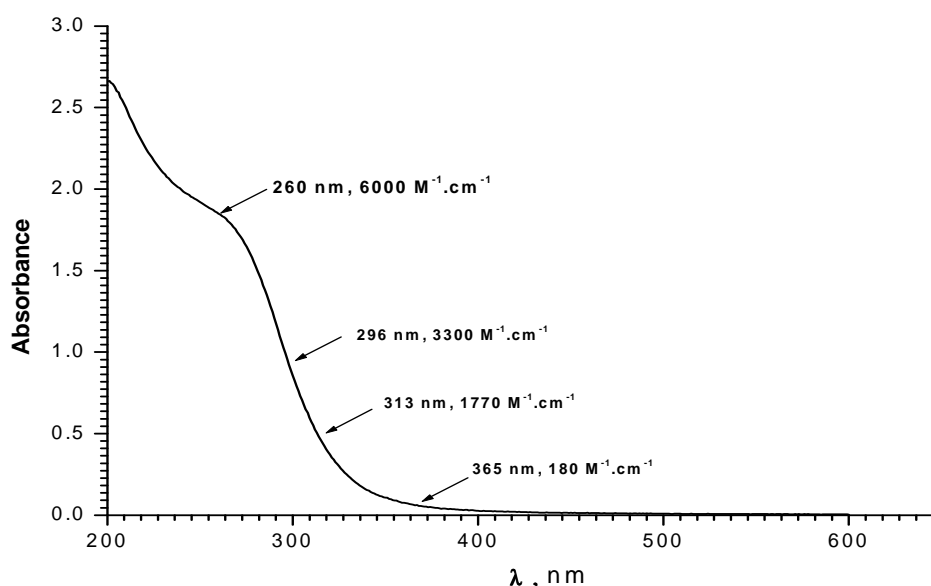


Figure 72 Spectre UV du complexe Fe-NTA (concentration : 0,1 mM)

### Solution de FeEDDS

100 ml d'une solution de FeEDDS de concentration 2 mM est préparée. L'EDDS utilisé est une solution à 30% massique dans l'eau. Tout comme pour la préparation du complexe FeNTA, le pH est ajusté à 4 avec de la soude. Le perchlorate de fer est ajouté et la solution est complétée à 100 mL avec de l'eau. Les spectres UV de l'EDDS et du FeEDDS sont présentés sur la **Figure 73**.

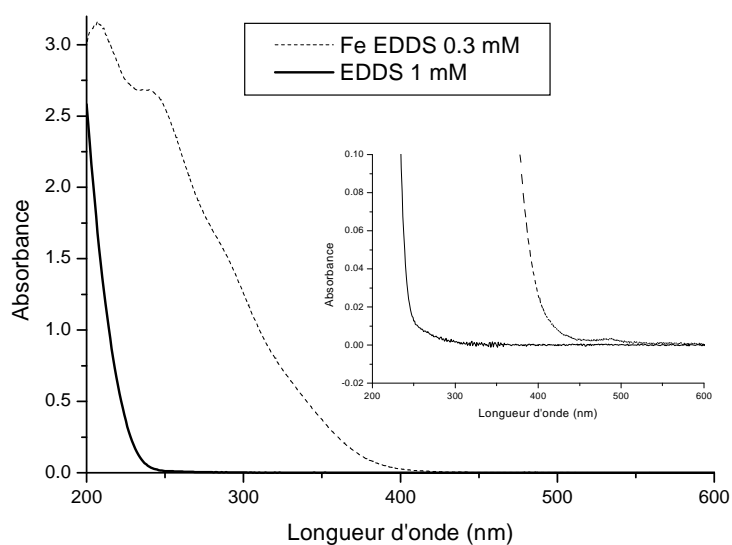


Figure 73 Spectres UV de l'EDDS (1 mM) et du FeEDDS (0,3 mM)

### Solution de Fe-citrate

Le complexe Fe-citrate (**Figure 74**) existe dans le commerce (Fe-citrate + 2,37 H<sub>2</sub>O + 8% citrate donc M = 287,7 g.mol<sup>-1</sup>). Il se présente sous la forme d'une poudre marron ; très sensible à la lumière, il est stocké dans un flacon teinté. Il est très soluble dans l'eau et la préparation de la solution se fait à l'obscurité. 100 ml de solution à C = 2 mM sont préparés.

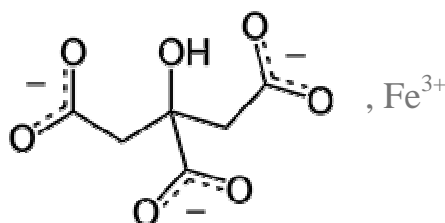


Figure 74 Complexe Fe-citrate



**Solution de  $\text{FeCl}_3$** 

Le chlorure de fer utilisé est hexahydraté ( $M = 270,3 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Il se présente sous la forme de cristaux jaunes. Très soluble dans l'eau mais très sensible à la lumière également, la préparation de la solution requiert l'obscurité. 100 ml de solution à  $C = 2 \text{ mM}$ , sont préparés.

**Milieu contenant la goethite**

La goethite, ou  $\alpha\text{-FeO(OH)}$  ( $M = 89 \text{ g.mol}^{-1}$ ), se présente sous la forme de particules solides noires. La goethite est très faiblement soluble dans l'eau. La quantité de goethite nécessaire pour l'expérience est dispersée dans l'eau par l'action d'ultrasons avant d'être utilisée. Les expériences menées en présence de fer sont réalisées dans les mêmes conditions i.e. en présence du même nombre de moles de fer soit 0,1 mmol pour 100 ml.

**Milieu contenant la magnétite**

La magnétite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ( $M = 231,5 \text{ g.mol}^{-1}$ ) se présente sous la forme d'une nanopoudre brun-noire. Peu soluble dans l'eau, elle est également dispersée dans l'eau sous l'action d'ultrasons avant d'être utilisée.

**Milieu contenant l'alginate et *R. rhodochrous* (étude du métabolisme de l'alginate par la bactérie)**

Une solution d'alginate à 400 mg/l a été préparée et ajoutée à 3 g de cellules puis incubée.

**I.4 Incubation**

L'incubation se fait dans un photo-bioréacteur (**Figure 75**) permettant de thermostat, d'agiter et d'éclairer les erlenmeyers. La température est maintenue par une lampe infra-rouge et un ventilateur tous deux couplés à un thermocouple. Le réacteur est fait de parois thermoisolantes. L'ensemble des études de dégradation sont menées à  $27^\circ\text{C}$ . Les erlenmeyers sont fixés sur la table d'agitation et agités à 200 rpm. L'agitation permet à la fois l'oxygénation et l'homogénéisation du milieu. Le système d'éclairage est constitué de 7 tubes fluorescents de 15 W TLD Philips® qui émettent entre 300 et 500 nm avec un maximum d'émission à 365 nm. L'intensité du flux lumineux du système d'irradiation a été mesurée avec un luxmètre Testo 545

pour s'assurer de l'homogénéité de l'intensité lumineuse pour les différents emplacements des erlenmeyers.



Figure 75 Photo-bioréacteur

## I.5 Extraits perchloriques

Les extraits perchloriques ont été préparés selon le protocole d'Aubert et al. (1996). Les cellules (10 g poids humide) sont très rapidement plongées dans l'azote liquide puis dégelées, ces deux opérations étant répétées plusieurs fois pour assurer la lyse complète des cellules. Ensuite, 1 ml d'acide perchlorique à 70% volumique est ajouté à la solution. La suspension ainsi obtenue est centrifugée à 15000 rpm pendant 15 minutes et à 4°C. Le surnageant est prélevé puis son pH est ajusté à 5 approximativement avec du  $\text{KHCO}_3$  à 2 M. Le surnageant est de nouveau centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour enlever le  $\text{KClO}_4$ . Le surnageant est plongé dans l'azote liquide et lyophilisé. Le résidu obtenu est dissous dans 2,5 ml d'eau contenant 10% de  $\text{D}_2\text{O}$  puis neutralisé à  $\text{pH} = 7,5$  avec une solution de KOH à 5 M et un tampon est ajouté (HEPES à 50 mM). Les cations divalents, en particulier  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont chélatés grâce à l'addition d'une quantité suffisante de CDTA (acide diaminocyclohexane tétraacétique) allant de 50 à 100  $\mu\text{mol}$  selon les échantillons. L'élimination de ces cations paramagnétiques est nécessaire pour l'obtention de signaux fins en RMN.

## **I.6 Expériences d'émulsification**

Afin de connaître les propriétés émulsifiantes des bactéries, des expériences d'émulsification ont été réalisées dans différents solvants d'après la méthode décrite par Iyer et al. (2006) : le pentane, l'hexane, le xylène, l'hexadécane et la paraffine. Le protocole consiste à mélanger 6 ml de solvant organique avec 4 ml de milieu, à vortexer pendant 3 minutes puis à laisser reposer. Le milieu testé est soit le milieu d'incubation des cellules après centrifugation, soit le milieu de culture total contenant les bactéries.

## II TECHNIQUES ANALYTIQUES

### II.1 Prélèvements

Deux prélèvements de 1 ml sont effectués pour chaque temps et pour chaque expérience. Les eppendorfs contenant ces échantillons sont centrifugés à température ambiante pendant 3 minutes à 12500 rpm. Les surnageants sont placés au congélateur (-40°C) jusqu'aux analyses. Avant analyse, les eppendorfs sont décongelés à température ambiante puis de nouveau centrifugés.

### II.2 Analyses de l'ABT, des métabolites et des photoproduits par HPLC

#### II.2.1 Analyses par HPLC

Les analyses quantitatives de routine pour déterminer la concentration en ABT, en 6OHABT et en 4OHABT sont effectuées par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). L'appareil utilisé est un Agilent 1100 series muni d'un détecteur à barrette de diodes. L'ensemble du système est contrôlé par le logiciel Agilent Chemstation.

Comme l'ABT et ses deux principaux métabolites sont des molécules peu polaires, nous avons travaillé en phase inverse avec la colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) de dimensions 4,6 x 250 mm et de granulométrie 5  $\mu$ m. Pour protéger la colonne, une pré-colonne de phase greffée C18 est ajoutée en amont. La colonne est placée dans un compartiment thermostaté à 25 °C.

Les analyses sont faites dans des conditions isocratiques avec une phase mobile polaire constituée de 75% d'eau et de 25% d'acétonitrile. Le débit est de 1 ml/min. La quantité d'échantillon injectée est de 10  $\mu$ l et l'acquisition est faite sur 15 minutes. Grâce au système de détection à barrette de diodes, les chromatogrammes sont acquis pour des longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm ; pour la quantification, nous travaillons au maximum d'absorption de l'ABT, c'est-à-dire à  $\lambda = 265$  nm.

### II.2.2 Pré-traitement SPE des échantillons contenant de l'alginate avant analyses HPLC

Lors des expériences faisant intervenir les billes d'alginate, une partie de cet alginate se dissout et colmate les colonnes HPLC. Il a donc fallu trouver un traitement pour l'éliminer sans modifier les concentrations de l'ABT et de ses métabolites. Le traitement SPE (Solid Phase Extraction) s'est avéré être une excellente solution. Le principe est basé sur celui de la chromatographie : une cartouche contenant une phase solide permet de séparer certaines molécules d'autres comme le montre la **Figure 76**.

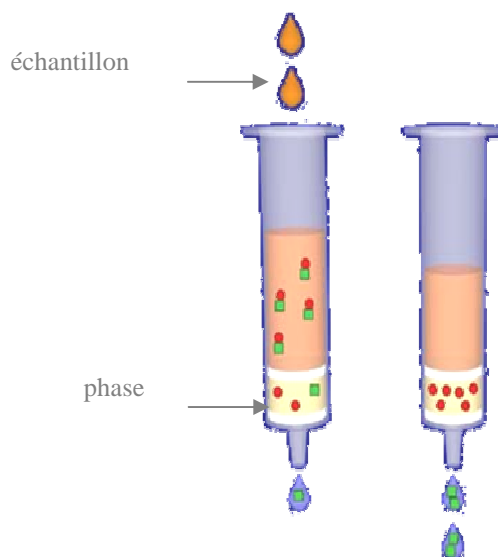


Figure 76 Principe du traitement SPE

Après avoir testé plusieurs types de phase (Oasis<sup>®</sup>Max, Oasis<sup>®</sup>HLB...), la plus performante s'est révélée être la phase Oasis<sup>®</sup>HLB (WATERS).

Le support Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) est un copolymère comprenant un monomère hydrophile et un monomère lipophile (**Figure 77**). Il retient les produits hydrophobes et non chargés comme l'ABT et ses métabolites et pas l'alginate polaire et chargé à pH = 7 qui passe donc avec la phase aqueuse.

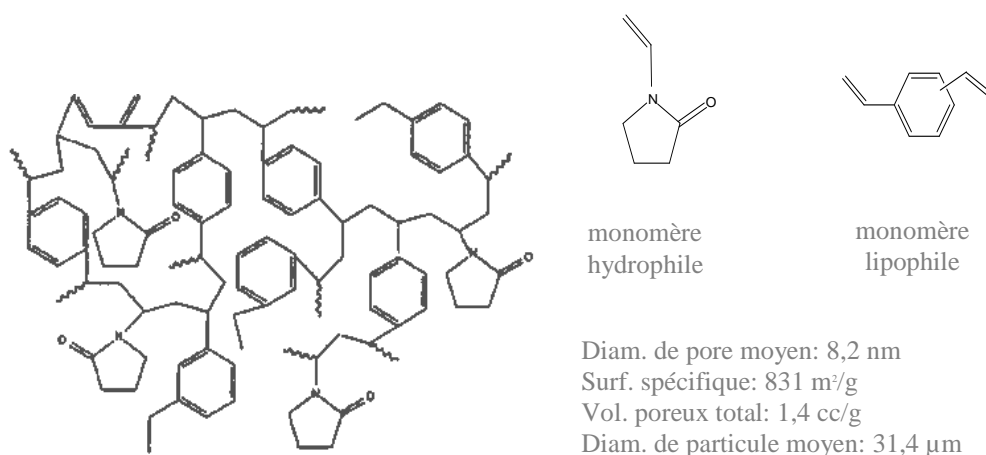


Figure 77 Structure de la phase de la cartouche Oasis<sup>®</sup> HLB

Nous utilisons des cartouches de 1 ml contenant 10 mg de phase. L'utilisation de la cartouche se fait en 3 étapes (**Figure 78**):

La 1<sup>ère</sup> étape est le **conditionnement**. La phase est activée par un solvant organique (350 µl de méthanol) pour permettre l'élimination des contaminants et favoriser les échanges dans l'adsorbant. Cette étape permet également une meilleure mouillabilité des frittés. La phase est ensuite rincée avec de l'eau (700 µl).

La 2<sup>ème</sup> étape correspond au **dépôt de l'échantillon**. L'échantillon (200 µl) est déposé sur la partie supérieure du lit de l'adsorbant. L'alginate n'ayant aucune affinité avec l'adsorbant, il n'est pas retenu. *A contrario*, l'ABT, le 6OHABT et le 4OHABT le sont. Pour apporter un maximum d'efficacité à la séparation, il faut veiller à ce que la vitesse d'écoulement ne soit pas trop rapide. La phase est ensuite rincée à l'eau (700 µl) qui ne présente pas d'affinité avec l'ABT ni avec ses produits de dégradation.

La 3<sup>ème</sup> étape est l'**élution**. Elle consiste à récupérer 100 % des composés d'intérêt retenus par la phase. Nous éluons avec de l'acétonitrile (200 µl). Une dilution par 4 avec de l'eau Milli-Q est ensuite effectuée afin d'avoir une quantité suffisante d'échantillon pour injecter en HPLC. Nous obtenons par ailleurs un mélange 75/25 en eau/acétonitrile reproduisant la composition de la phase mobile utilisée en HPLC.

**CONDITIONNEMENT**1) MeOH : 350  $\mu$ l2) Eau : 700  $\mu$ l**DEPOT**Echantillon : 200  $\mu$ l**LAVAGE**Eau : 700  $\mu$ l**ELUTION**1) Acétonitrile: 200  $\mu$ l2) Dilution : 600  $\mu$ l

Figure 78      Protocole d'utilisation de la cartouche SPE Oasis® HLB

Les traitements sont effectués de manière automatisée grâce à une plateforme robotisée TECAN® (en photo **Figure 79**) pilotée par le logiciel Freedom Evoware. Un module spécifiquement conçu pour le traitement SPE en plaque 96 cartouches et muni d'un système permettant de faire le vide et d'aspirer les différentes phases liquides a été utilisé.

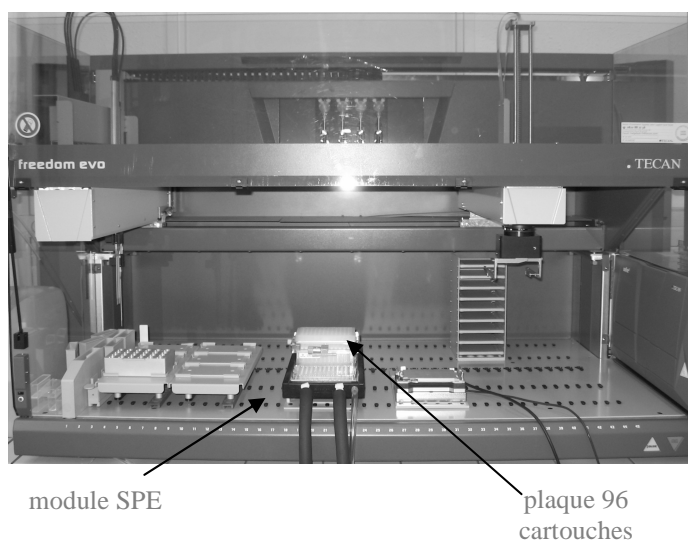


Figure 79      Plateforme robotisée TECAN® avec le module SPE

Nous nous sommes assurés qu'en utilisant cette phase, l'ABT et ses métabolites étaient récupérés intégralement après la phase d'élution et que des analyses quantitatives pouvaient être réalisées.

### II.3 Analyses du fer par dosage UV-visible

Au cours des expériences, nous avons suivi l'évolution de la concentration en fer total et en fer (II) dans le milieu d'incubation. Les dosages du fer ont été réalisés après complexation du fer par lecture de l'absorbance en spectrophotométrie UV-visible. Le dosage est réalisé de manière automatisée avec la plateforme robotisée TECAN<sup>®</sup> pilotée par le logiciel Freedom Evoware et couplée à un spectrophotomètre UV-visible Safire<sup>2</sup> qui permet de faire des mesures d'absorbance.

#### Dosage du fer total

Le réactif utilisé est le sel de sodium de l'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-diphényl-1,2,4-triazine-4,4' disulfonique appelé communément ferrocine (**Figure 80**). Ce réactif est un agent complexant du fer (II) (Stookey, 1970).

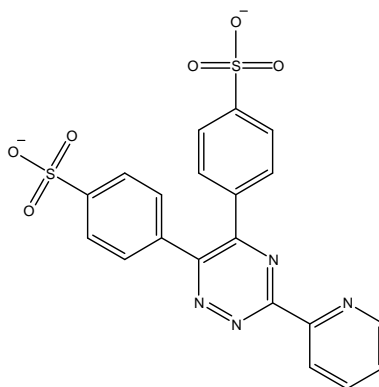


Figure 80      Structure de la ferrocine

Pour doser le fer total, il faut préalablement réduire le fer(III) provenant du complexe Fe-NTA en fer(II). Pour cela, nous utilisons le chlorhydrate d'hydroxylamine :





Le spectre UV du complexe fer (II)-ferrocine (**Figure 81**) présente un maximum à  $\lambda = 562$  nm et son coefficient molaire d'absorption à cette longueur d'onde est  $\varepsilon = 26500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

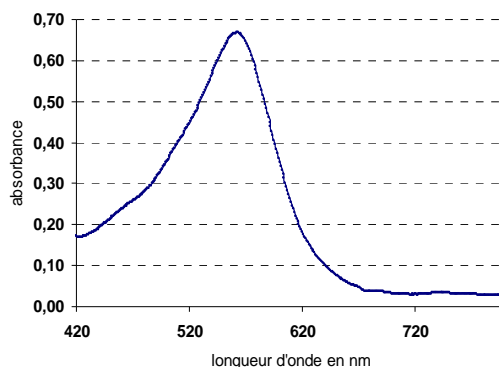


Figure 81 Spectre UV du complexe fer-ferrocine (  $420 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$  )

Avant chaque série d'analyses, une courbe de calibration est effectuée. Pour cela, une solution mère de perchlorate de fer hexahydraté  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de concentration  $C_0 = 5 \text{ mM}$  est préparée. Un programme a été écrit pour la préparation et le dosage de solutions filles de concentrations en fer allant jusqu'à  $1 \text{ mM}$  (0,00 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,50, 0,80 et  $1 \text{ mM}$ ). Une fois la courbe de calibration établie (3 répétitions), les échantillons prélevés au cours des expériences de cinétiques sont analysés à l'aide de plaques 96 puits (**Figure 82**).

Le protocole de dosage est le suivant :

- 10  $\mu\text{l}$  d'échantillon
- 15  $\mu\text{l}$  d'hydroxylamine
- 150  $\mu\text{l}$  d'eau Milli-Q
- Agitation pendant 1 minute
- 15  $\mu\text{l}$  de ferrocine
- 30  $\mu\text{l}$  d'acétate d'ammonium
- 30  $\mu\text{l}$  d'eau Milli-Q
- Lecture à  $\lambda = 562 \text{ nm}$

Les analyses sont réitérées deux fois et confirment la reproductibilité de la méthode.



Figure 82      Plaque 96 puits : dosage du fer total dans une série d'échantillons

### Dosage du fer (II)

Le fer (II) est dosé avec un autre agent complexant, la 1,10-phénanthroline qui donne un complexe rouge-orangé stable pour des pH compris entre 2 et 9 (**Figure 83**).

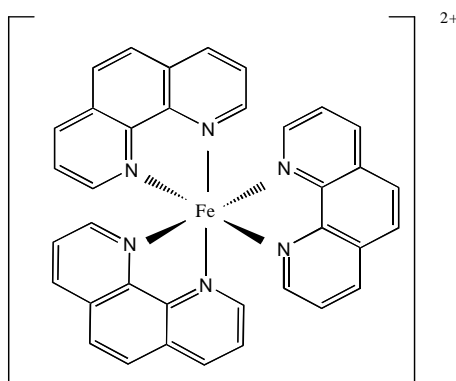


Figure 83      Complexe fer (II)- 1,10-phénanthroline

Le spectre UV du complexe fer (II)-1,10-phénanthroline (**Figure 84**) présente un maximum d'absorbance à  $\lambda = 510$  nm, avec un  $\varepsilon = 11180 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

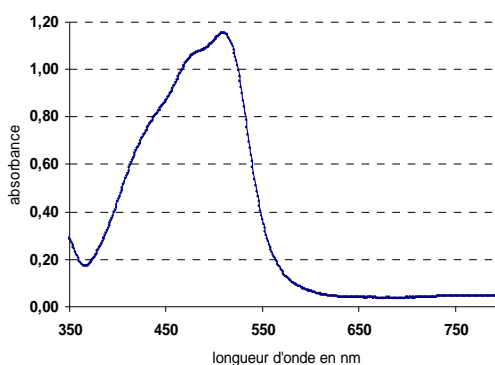


Figure 84      Spectre UV du complexe fer-phénanthroline (  $350 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$  )

Avant chaque série d'analyses, une courbe de calibration est effectuée. Pour cela, une solution mère de sel de Mohr  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de concentration  $C_0 = 5 \text{ mM}$  est préparée. Un programme a été écrit pour la préparation et le dosage de solutions filles de concentrations en fer allant jusqu'à 1 mM (0,00 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,50, 0,80 et 1 mM). Cette courbe de calibration est réalisée deux fois avant chaque série de dosages. Comme pour le dosage du fer total, une fois la courbe de calibration établie, les échantillons sont analysés à l'aide de plaques 96 puits (**Figure 85**).

Le protocole de dosage est le suivant :

- 30  $\mu\text{l}$  d'échantillon
- 15  $\mu\text{l}$  de phénanthroline
- 30  $\mu\text{l}$  d'acétate de sodium
- 175  $\mu\text{l}$  d'eau Milli-Q
- Mise à l'obscurité pendant 10 minutes
- Lecture à  $\lambda = 510 \text{ nm}$

Les analyses sont répétées deux fois et confirment la reproductibilité de la méthode.

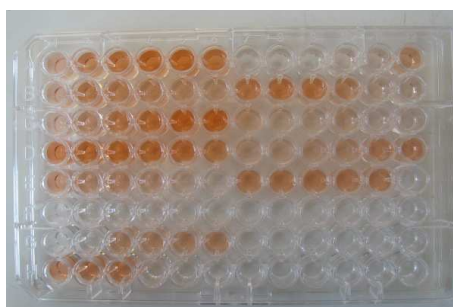


Figure 85      Plaque 96 puits : dosage du fer II

## II.4 Analyses par RMN

### II.4.1 RMN $^1\text{H}$

#### II.4.1.1 RMN $^1\text{H}$ pour valider le traitement SPE

Le spectromètre utilisé est un Bruker Avance 500 équipé d'une sonde inverse 5 mm trois noyaux  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  avec une bobine de gradient sur l'axe z. Le pic de résonance de l'eau est supprimé par une méthode de présaturation. Le TSPd<sub>4</sub>

ou triméthylsilylpropionate tétradeutééré (5 mM) dissous dans D<sub>2</sub>O a été utilisé comme référence interne. Voici les paramètres d'acquisition utilisés : nombre de scans : 128 – durée du pulse à 90°: 6,3 µs – délai de relaxation: 5 s – durée d'acquisition: 4,67 s – fenêtre spectrale: 7002 Hz – nombre de points : 65536. Les spectres ont été traités avec Topspin version 2.0. Pour la préparation des échantillons, 60 µl de TSPd<sub>4</sub> sont ajoutés à 540 µl d'échantillon.

#### **II.4.1.2 RMN <sup>1</sup>H pour l'étude du métabolisme de l'alginate par *R. rhodochrous***

Des échantillons de 5 ml ont été prélevés toutes les 24 heures, centrifugés puis lyophilisés. Le résidu est alors dissous dans 500 µl de D<sub>2</sub>O puis lyophilisé à nouveau et redissous dans 500 µl de D<sub>2</sub>O avant d'être analysé par RMN. Les expériences ont été réalisées à l'Institut de Chimie de l'Académie des Sciences de Slovaquie avec un spectromètre Varian 600 MHz Unity Inova 600 NB équipé avec une sonde trois noyaux de 5 mm à détection inverse <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N accordée avec une bobine possédant un gradient sur l'axe z. Le pic de résonance de l'eau a été supprimé par une méthode de présaturation, le TSPd<sub>4</sub> a également été utilisé comme référence interne et les spectres ont été traités sur Topspin version 2.0.

### **II.4.2 Analyses du métabolisme par RMN *in vivo***

#### **II.4.2.1 Description du système de RMN *in vivo***

Les expériences de RMN *in vivo* ont été réalisées avec les bactéries encapsulées dans les billes d'alginate pour les études de RMN du <sup>31</sup>P et avec les bactéries en suspension pour les études de RMN du <sup>13</sup>C. Dans ce dernier cas, les cellules sont libres et circulent avec le milieu depuis l'erlenmeyer où barbote l'oxygène jusqu'au tube RMN placé dans la sonde à l'intérieur du spectromètre. L'intérêt d'utiliser des microorganismes immobilisés dans des billes (diamètre : 0,2 mm) pour la RMN du <sup>31</sup>P est de pouvoir les placer à l'intérieur du tube RMN de façon à les conserver dans la zone d'analyse tout au long de l'expérience. Ce système permet, par rapport à des cellules libres, d'augmenter la concentration en composés phosphorylés et donc d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit et donc une ligne de base très correcte. Il n'a pu, en revanche, être mis en œuvre pour la RMN du <sup>13</sup>C car l'apport d'atomes de carbone par l'alginate est trop important et complexifie

l'interprétation des spectres ; dans ce cas précis nous avons alors travaillé avec des cellules libres.

Le principe du système de perfusion est basé sur la circulation d'un milieu entre un erlenmeyer externe thermostaté à 27°C grâce à un bain-marie et un tube RMN placé à l'intérieur de la sonde. Le débit est contrôlé par une pompe péristaltique (20 ml/min). L'homogénéité et l'oxygénation du milieu sont ainsi assurées ; l'oxygénation est par ailleurs optimisée par un bullage d'oxygène dans l'erlenmeyer (voir schéma **Figure 86**). Un tel système permet à *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 qui est une bactérie aérobie stricte de survivre plusieurs jours à l'intérieur de l'aimant.

Dans le tube RMN, quatre tuyaux assurent le fonctionnement du système de perfusion : un tuyau d'entrée placé au milieu du tube assure l'alimentation, un tuyau de sortie principale situé en bas du tube, un tuyau de sortie secondaire situé en haut du tube et permettant d'équilibrer le niveau de solution dans le tube et un tube de sécurité placé tout en haut du tube et qui aspire le trop plein en cas de dysfonctionnement du système. Les expériences de RMN *in vivo* ont été réalisées au CEA de Grenoble pour les études menées en présence de lumière et à Clermont-Ferrand pour celles menées en absence de lumière.

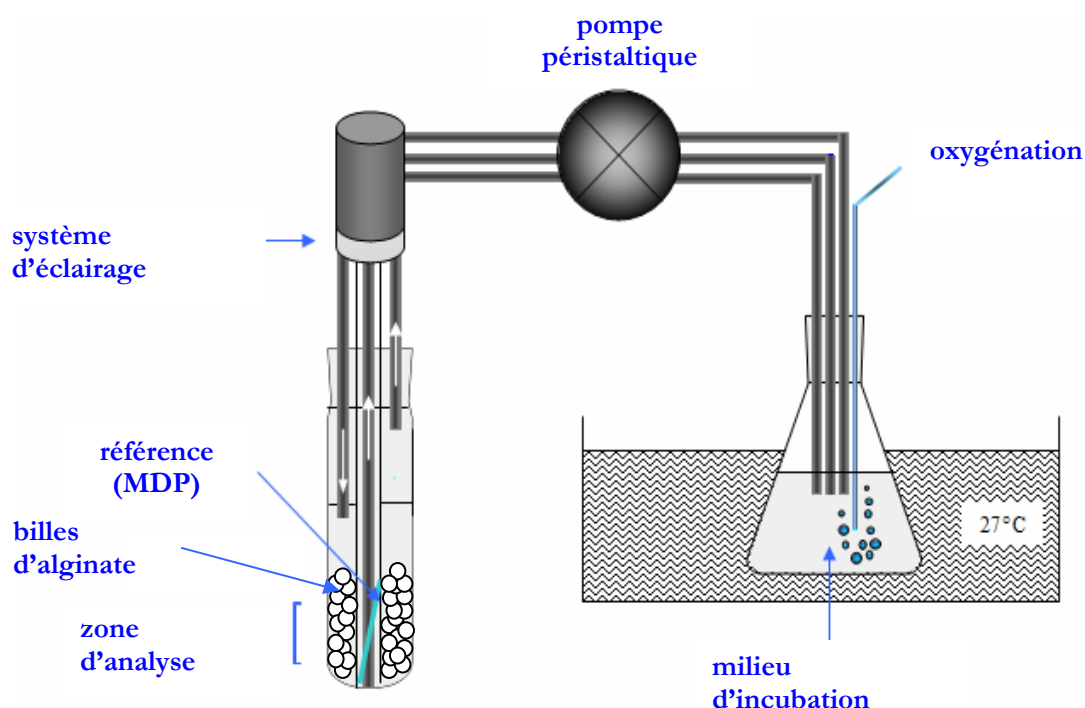


Figure 86 Schéma du système de perfusion mis en place pour réaliser la RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo* (avec système d'éclairage pour les expériences réalisées au CEA de Grenoble- sans éclairage pour celles réalisées au SEESIB à Clermont-Ferrand)

#### II.4.2.2 Expériences avec lumière (conditions 1)

Les expériences effectuées au CEA de Grenoble ont été réalisées sur un spectromètre RMN Bruker 400 MHz équipé d'une sonde 25 mm multi-noyaux accordée à 162 MHz pour le  $^{31}\text{P}$ . A l'intérieur du tube dans lequel sont placées les bactéries immobilisées, est placé un autre tube en quartz dans lequel sont gravées des stries qui permettent la réflexion de la lumière émise par une lampe (1800 Watts – Oriel – spectre solaire) (**Figure 87**). 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$  sont ajoutés au milieu d'incubation pour permettre d'asservir le champ (lock) et de régler son homogénéité (shim).

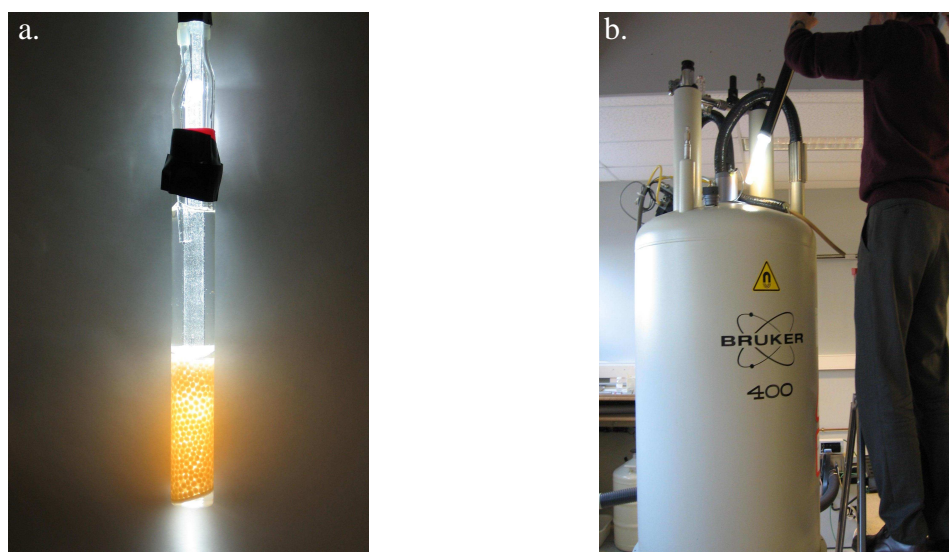


Figure 87 (a) Tube contenant les cellules encapsulées muni d'un système d'éclairage par le haut et doté au centre d'un tube en quartz strié réfléchissant la lumière (b) Mise en place du tube à l'intérieur du spectromètre

Voici les paramètres d'acquisition utilisés : durée du pulse à  $90^\circ$ : 70  $\mu\text{s}$  – délai de relaxation: 0,6 s – temps d'acquisition: 0,2 s – fenêtre spectrale: 9800 Hz - séquence de découplage du  $^1\text{H}$  Waltz-16.

#### II.4.2.3 Expériences sans lumière (conditions 2)

Après avoir travaillé en collaboration avec le CEA de Grenoble, nous avons reproduit le système dans notre laboratoire. La sonde utilisée permet de travailler avec des tubes d'analyse de plus petit diamètre ce qui ne nous permet pas

d'installer un système d'éclairage. Le spectromètre RMN utilisé est un spectromètre Bruker Avance 500 MHz équipé d'une sonde Broadband de 10 mm accordée respectivement à 202 MHz ou 125 MHz selon que les études se font sur le  $^{31}\text{P}$  ou le  $^{13}\text{C}$ . Les spectres sont traités avec le logiciel Topspin version 2.0.

#### II.4.2.3.1 Spectroscopie RMN $^{31}\text{P}$

De l'acide Méthylène DiPhosphonique ou MDP (**Figure 88**) préparé à 0,25 mM dans un tampon HEPES (Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) 100 mM à pH 7,5 est placé dans un capillaire et est utilisé de manière *in situ* comme référence interne pour la calibration des déplacements chimiques (16,38 ppm).

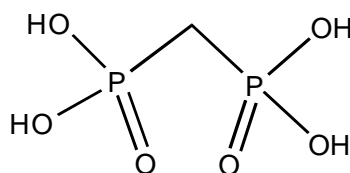


Figure 88 Acide méthylène diphosphonique

Le milieu d'incubation varie selon les expériences mais contient toujours 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$ . Les paramètres d'acquisition sont les suivants : nombre de scans: 25400 (correspondant à 2 heures d'acquisition pour chaque spectre) – durée du pulse à  $90^\circ$ : 10  $\mu\text{s}$  – délai de relaxation: 0,05 s – temps d'acquisition: 0,2 s – fenêtre spectrale: 11160 Hz –séquence de découplage du  $^1\text{H}$  Waltz-16.

#### II.4.2.3.2 Spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

Le benzène placé dans un capillaire sert ici de référence interne pour la calibration des déplacements chimiques (128.39 ppm relatif au TMS (Triméthylsilane, 0 ppm)). Le milieu d'incubation contient 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$ . Les paramètres d'acquisition sont les suivants: nombre de scans: 3000 – durée du pulse à  $90^\circ$ : 20  $\mu\text{s}$  – délai de relaxation: 1 s – temps d'acquisition: 0,14 s – fenêtre spectrale: 30303 Hz – séquence de découplage du  $^1\text{H}$  Waltz-16.

#### II.4.2.3.3 Analyses des extraits perchloriques

Le spectromètre utilisé est un Bruker Avance 400 MHz équipé d'une sonde 5 mm QNP 1H/X avec une bobine possédant un gradient en z accordée à 162 ou 100,6 MHz selon que les études se font respectivement sur le  $^{31}\text{P}$  ou sur le  $^{13}\text{C}$ . La résonance du deutérium de  $\text{D}_2\text{O}$  est utilisée pour le signal du lock. Les spectres sont traités avec le logiciel Topspin version 2.0.

#### Spectroscopie RMN $^{31}\text{P}$ .

L'acide méthylphosphonique (2 mM) est utilisé comme référence interne permettant la calibration des déplacements chimiques (22.9 ppm). Les échantillons contiennent 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$ . Les paramètres d'acquisition sont les suivants: nombre de scans: 2000 – durée du pulse à 30°: 2.2  $\mu\text{s}$  – délai de relaxation: 2 s – temps d'acquisition: 3,4s – fenêtre spectrale: 9690 Hz – nombre de points: 64000 – séquence de découplage du  $^1\text{H}$  Waltz-16.

#### Spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$ .

10 mM de TSPd<sub>4</sub> ou maléate sont utilisés comme référence interne pour la calibration des déplacements chimiques (0 ppm pour le TSPd<sub>4</sub> et 131.5 ppm pour le maléate relatif au TMS). Les échantillons contiennent 10 % de  $\text{D}_2\text{O}$ . Les spectres 1D sont acquis avec la séquence de découplage du  $^1\text{H}$  Waltz-16. Les paramètres d'acquisition sont les suivants: nombre de scans: 1000 – durée du pulse : 2.5  $\mu\text{s}$  – délai de relaxation: 2s – temps d'acquisition: 1,3 s – fenêtre spectrale: 25125 Hz – nombre de points: 64000.

#### Spectres 2D HSQC

Les spectres 2D HSQC sont obtenus avec un détecteur de phase en quadrature dans les deux dimensions, avec une détection States-TPPI dans la dimension indirecte. Le découplage du  $^1\text{H}$  est réalisé lors de l'acquisition. La dimension F1 est définie par l'acquisition de 256 expériences – nombre de points pour la dimension F2 : 1000 – nombre de scans : 16 ou 32.

### II.5 Mesure du Carbone Organique Total (TOC)

La mesure du carbone organique total a été réalisée sur un Analyseur de Carbone Organique Total SHIMADZU TOC-5050A. L'appareil mesure le Carbone Total (TC) ainsi que le Carbone Inorganique (IC) ce qui nous donne accès



au Carbone Organique Total par simple différence TC - IC. L'appareil est programmé pour réaliser les mesures deux fois mais si l'écart entre les valeurs des deux premières mesures est trop important, il en réalise une troisième. La limite de détection de l'appareil est de 50 ppb et permet de mesurer jusqu'à 4000 ppm en concentration de carbone.

### Mesure du TC

L'échantillon est chauffé à 690°C dans un tube à combustion en présence d'un catalyseur d'oxydation (billes d'alumine recouvertes de platine). Le carbone présent dans l'échantillon est ainsi transformé de manière quantitative en CO<sub>2</sub>. Le dosage du CO<sub>2</sub> est réalisé par mesure de l'absorbance dans l'infra-rouge grâce à une cellule NDIR (Non Dispersif Infra-Red gaz) placé à la sortie du tube à combustion. Une courbe d'étalonnage est réalisée (**Figure 89**) avant chaque série d'expériences. Pour cela, une solution mère d'hydrogénophthalate de potassium (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOK)(COOH), M = 204,22 g.mol<sup>-1</sup>) de concentration en carbone de 1000 mg/L est réalisée : 1,0625 g d'hydrogénophthalate de potassium sont dissous dans 500 mL d'eau Milli-Q. Une gamme de solutions filles allant de 0 mg/L de carbone jusqu'à 50 mg/L est réalisée à partir de cette solution mère et de manière exacte avec des volumes pesés lors des dilutions.

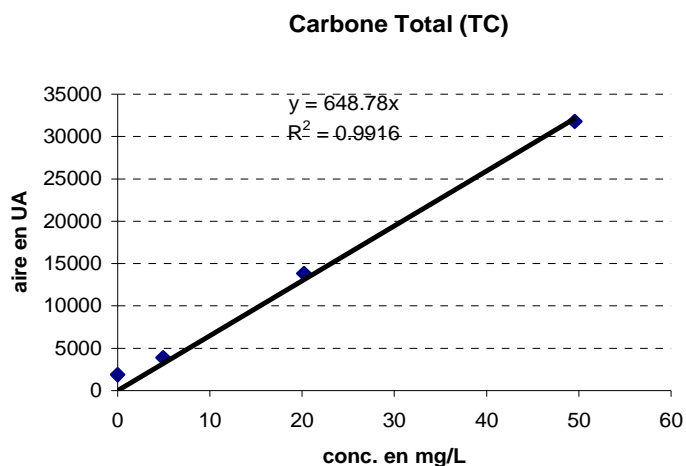


Figure 89 Courbe de calibration du TC

### Mesure de l'IC

Le carbone inorganique présent dans l'échantillon est transformé en CO<sub>2</sub> après réaction avec de l'acide phosphorique à 25 %. Le CO<sub>2</sub> est ensuite détecté par la

cellule NDIR. Une courbe de calibration est réalisée avant chaque série d'expériences (**Figure 90**). Pour ce faire, une solution mère contenant une concentration en carbone de 1000 mg/L est réalisée à partir de bicarbonate de sodium (ou hydrogénocarbonate de sodium  $\text{NaHCO}_3$ ,  $M = 84,007 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $M = 105,989 \text{ g.mol}^{-1}$ ) : 0,875 g de bicarbonate de sodium et 1,1025 g de carbonate de sodium sont dissous dans 250 mL d'eau Milli-Q.

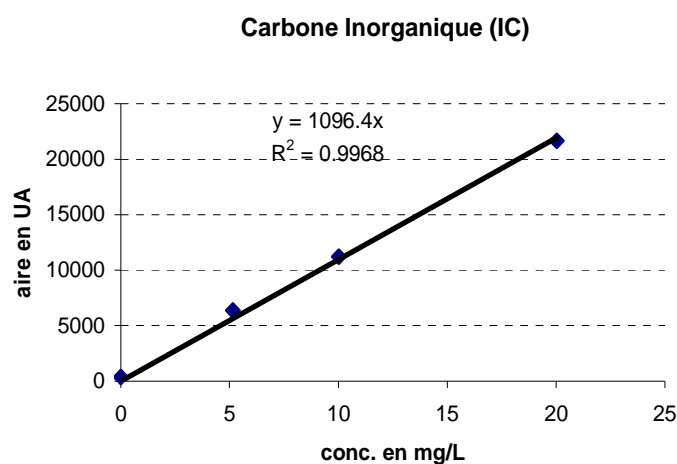
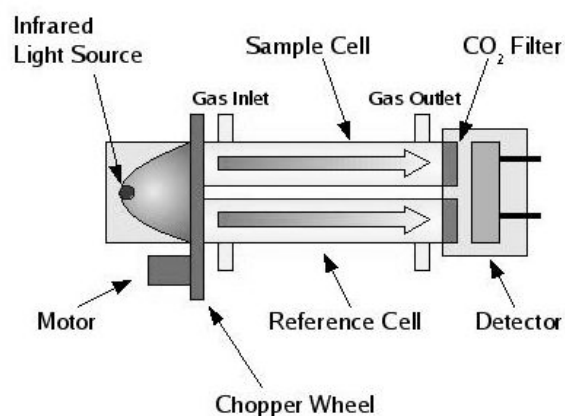


Figure 90 Courbe de calibration de l'IC

### Système de détection du $\text{CO}_2$

Le principe de fonctionnement d'une cellule NDIR est le suivant : une source émet des radiations infra-rouge ( $\lambda = 4,3 \mu\text{m}$ ) dans deux tubes, l'un constituant la référence (scellé et rempli d'argon) et l'autre balayé par de l'air (reconstitué en  $\text{O}_2/\text{N}_2$ ) chargé du  $\text{CO}_2$  provenant de l'échantillon. Un détecteur, situé au fond du tube, vibre en fonction de l'intensité du faisceau infra-rouge ; cette vibration est ensuite convertie en signal électrique pour finalement donner une valeur de la concentration après réalisation d'une courbe étalon. Le passage du  $\text{CO}_2$  dans le tube absorbe une certaine quantité de ces radiations infra-rouge si bien que le détecteur vibre proportionnellement.

Figure 91 Principe de fonctionnement d'une cellule NDI





## **Chapitre 4**

### **RESULTATS**

## I ETUDE COMPARATIVE DE LA DEGRADATION DE L'ABT : SYSTEME AVEC CELLULES LIBRES ET SYSTEME AVEC CELLULES IMMOBILISEES

Les travaux réalisés par Bunescu (2006) ont mis en évidence une forte accélération de la biodégradation de l'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* en présence du complexe FeNTA en présence ou en absence de lumière. Afin de voir si cette dégradation de l'ABT pouvait être améliorée, nous avons immobilisé les cellules dans un gel d'alginate. Ce procédé technologique facilite la manipulation des bactéries qui peuvent plus facilement être réutilisées. De plus, ce système est plus proche des conditions environnementales où les microorganismes sont le plus souvent immobilisés et non sous forme planctonique.

L'objectif de l'étude a donc été de comparer la biodégradation de l'ABT par des cellules libres et immobilisées en présence ou non de FeNTA et en présence ou non de lumière. Plus précisément, nous avons cherché à :

- 1) comparer les voies de dégradation dans les deux systèmes et leur efficacité
- 2) savoir si le complexe de fer stimulait toujours la dégradation dans le cas du système avec les cellules immobilisées (système IC) et si les mécanismes observés avec les cellules en suspension pouvaient être extrapolés à d'autres conditions physiologiques telles l'encapsulation

Nous avons choisi de travailler avec une matrice de gel d'alginate de calcium, une technique couramment utilisée car peu traumatisante pour les cellules . La présence de cette matrice n'est pas sans conséquences, aussi avons-nous dû mener des études complémentaires:

- 1) pour savoir si l'état énergétique des cellules est modifié dans de telles conditions ; étude menée par RMN du  $^{31}\text{P}$
- 2) pour savoir si *R. rhodochrous* métabolise ou non l'alginate dans lequel elle est encapsulée ; étude menée par RMN du  $^1\text{H}$
- 3) pour trouver un traitement permettant d'éliminer l'alginate dissous dans le milieu afin de pouvoir analyser l'ABT et ses produits de dégradation par HPLC (on évite ainsi un encrassement rapide des colonnes) ; traitement mis au point par SPE
- 4) pour connaître les taux d'adsorption de l'ABT et du FeNTA sur les billes ; étude menée par HPLC et par complexométrie

## I.1 Etudes préalables liées à la présence d'alginate

### I.1.1 Etat énergétique de *R. rhodochrous* dans la matrice d'alginate de calcium

Nous avons comparé l'état métabolique énergétique des cellules libres et des cellules encapsulées dans les billes d'alginate de calcium par RMN du  $^{31}\text{P}$  *in vivo* (Grivet et Delort, 2008). Nous avons pu identifier grâce à la littérature (**Tableau 11**) les différents métabolites phosphorylés présents sur les spectres. Les spectres obtenus pour les deux systèmes sont donnés **Figure 92**.

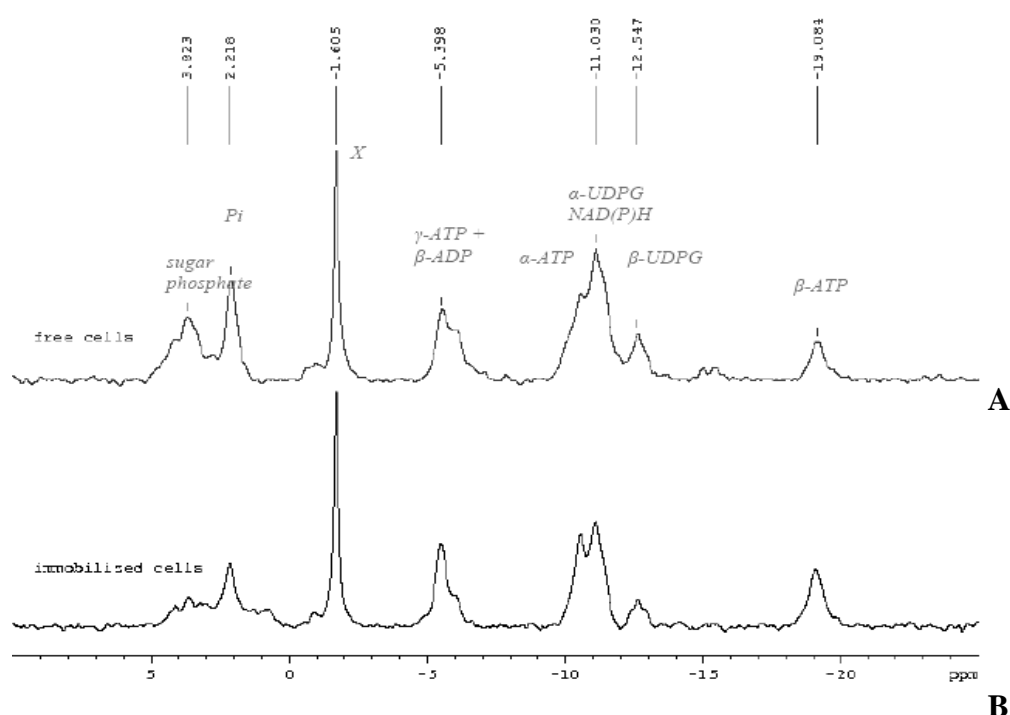


Figure 92 Spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  acquis *in vivo* (A) cellules libres – (B) cellules immobilisées – X est un métabolite non identifié

Quel que soit le système, les marqueurs métaboliques présentent les mêmes caractéristiques et les mêmes abondances. Si nous nous intéressons plus particulièrement au pH intracellulaire dont la valeur est accessible grâce au déplacement chimique du phosphate inorganique (Pi), nous observons un pH identique dans les deux cas, d'une valeur égale à 7,7. Les concentrations en ATP, déterminées à partir du signal du  $\beta\text{-ATP}$  car il est le seul signal à être isolé et donc exploitable, sont elles aussi égales. La **Figure 92** montre donc clairement que

l'encapsulation de la bactérie *Rhodococcus rhodochrous* dans les billes d'alginate ne modifie pas son état énergétique.

### I.1.2 Métabolisme de l'alginate par *R. rhodochrous*

L'alginate est une source de carbone potentielle pour la bactérie (Kitamikado et al., 1992) par conséquent, son utilisation éventuelle par *R. rhodochrous* a été étudiée. Une incubation de *R. rhodochrous* avec une solution aqueuse d'alginate (400 mg/l) a été réalisée durant 9 jours. Des prélèvements ont été analysés par RMN du  $^1\text{H}$  *in situ* sans purification des échantillons. Les spectres sont présentés **Figure 93**.

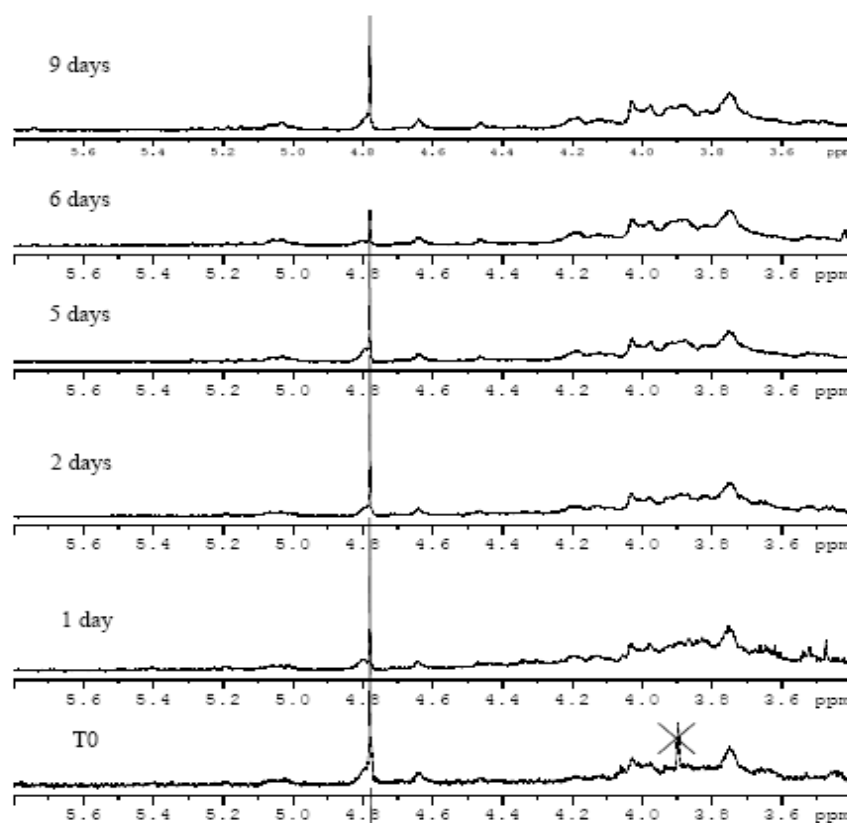


Figure 93 Spectres de RMN  $^1\text{H}$  montrant l'évolution de la dégradation de l'alginate par *R. rhodochrous* sur une période de 9 jours (X est un artefact)

La **Figure 93** montre que la zone des sucres de l'alginate (entre 3,5 et 5,2 ppm) n'évolue pas avec le temps. Les signaux sont les mêmes, ils conservent leur intensité prouvant ainsi que les cellules n'utilisent pas l'alginate comme source de carbone.

### I.1.3 Traitement des prélèvements pour l'élimination de l'alginate

L'agitation mécanique des erlenmeyers dans le photo-bioréacteur lors des incubations entraîne une dissolution partielle de l'alginate. Sa présence est problématique pour les études HPLC car il colmate les colonnes. Nous avons dû mettre au point un traitement pour éliminer l'alginate dissous tout en conservant nos composés d'intérêt et ce, de manière quantitative. Nous avons opté pour la technique de la SPE (Solid Phase Extraction) avec le support Oasis<sup>®</sup> HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) qui est à la fois hydrophile et lipophile (**Figure 77**). Il retient ainsi les produits hydrophobes et non chargés comme l'ABT et ses métabolites et laisse passer l'alginate qui est polaire et chargé à pH = 7. Nous avons alors vérifié le taux de recouvrement de nos composés d'intérêt.

#### Récupération de l'ABT

Les essais ont été effectués sur une cartouche Oasis<sup>®</sup> HLB de contenance 1 ml (10 mg de phase) avec 4 solutions de concentration 0,5 mM - 0,25 mM - 0,125 mM - 0,1 mM, préparées à partir de la même solution mère. Ces solutions ont été injectées en HPLC avant et après traitement SPE. Le protocole suivi est le suivant : la cartouche est conditionnée avec 1 ml de méthanol puis rincée avec 2 ml d'eau. 1 ml de solution d'ABT (0,5 mM) est déposé sur la cartouche, puis la cartouche est lavée avec 2 ml d'eau. Enfin, nous avons élué avec 1 ml d'acétonitrile.

Nous présentons ici l'exemple de la solution d'ABT à 0,5 mM. Chaque étape du traitement a été suivie par HPLC, les chromatogrammes sont présentés **Figure 94**, **Figure 95**, **Figure 96**.

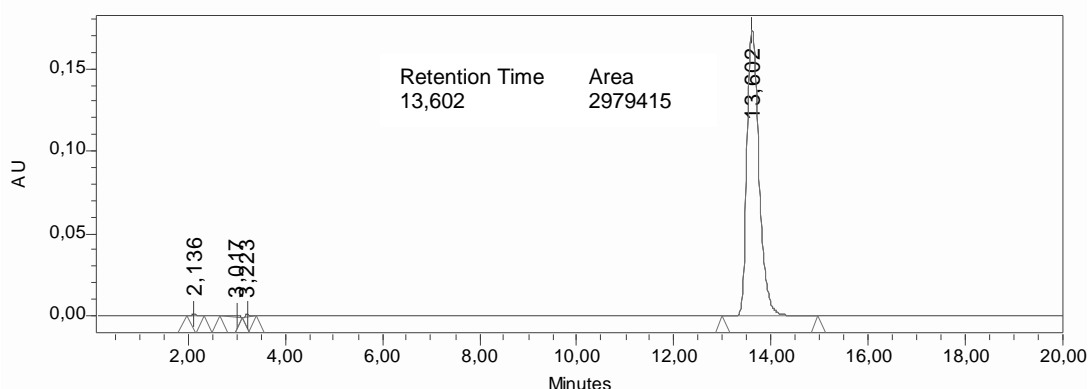


Figure 94

Chromatogramme d'une solution mère d'ABT à 0,5 mM avant SPE



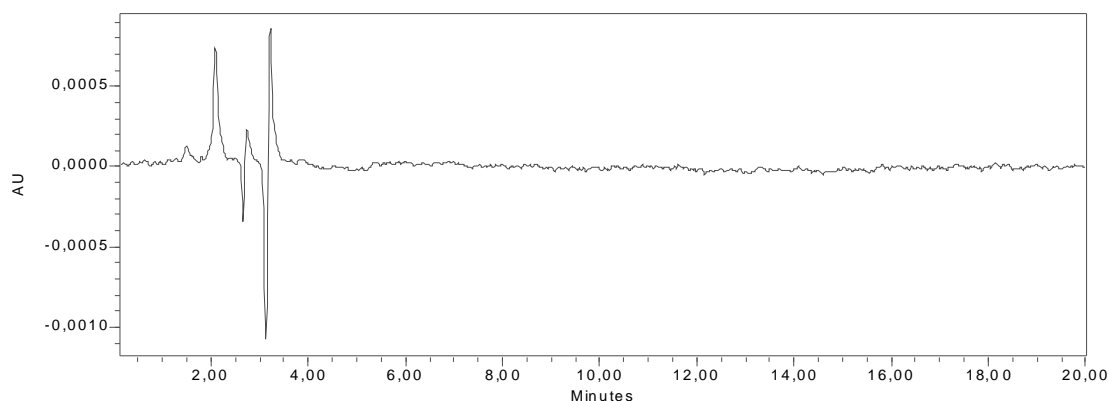


Figure 95 Chromatogramme après dépôt de 1 ml d'une solution d'ABT à 0,5 mM

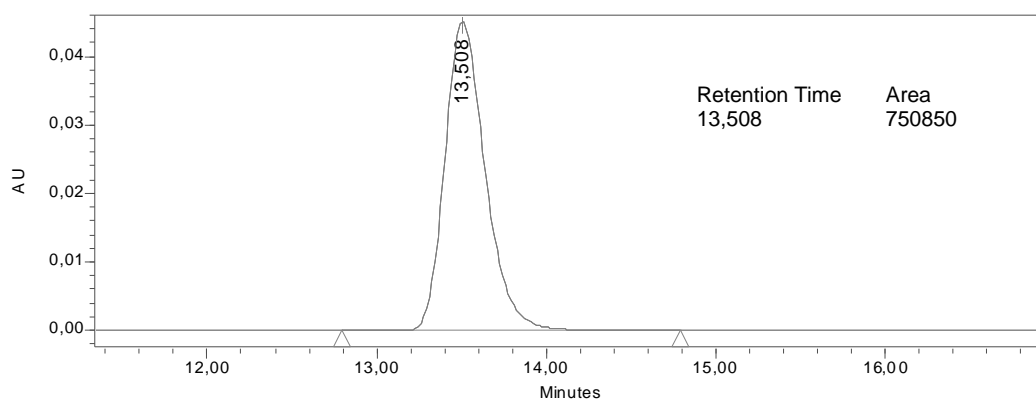


Figure 96 Chromatogramme après élution avec 1 ml d'acétonitrile et dilution x4

L'expérience a été reproduite 3 fois. Nous avons obtenu un taux de recouvrement de l'ABT de **100%**. L'ABT est retenu quantitativement sur la phase HLB et l'élution permet de le décrocher complètement.

### Récupération du 6OHABT

La procédure suivie est la même que pour l'ABT en partant de 4 solutions de 6OHABT de concentrations 0,5 mM - 0,25 mM - 0,125 mM - 0,1 mM, préparées à partir de la même solution mère.

Nous présentons ici l'exemple d'une solution de 6OH-ABT à 0,5 mM. 1 ml de cette solution a été traité sur la cartouche. Chaque étape du traitement a été suivie par HPLC, les chromatogrammes sont présentés **Figure 97, Figure 98, Figure 99.**

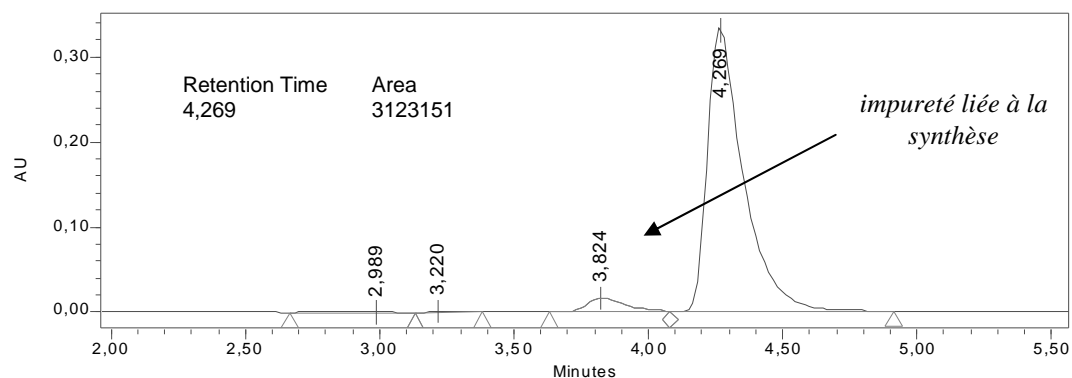


Figure 97 Chromatogramme d'une solution mère de 6OHABT à 0,5 mM

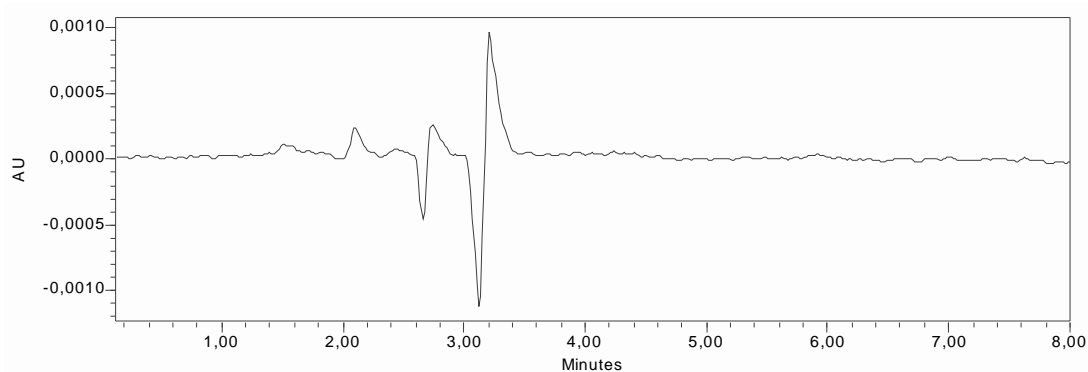


Figure 98 Chromatogramme après dépôt de 1 ml d'une solution de 6OH-ABT à 0,5 mM

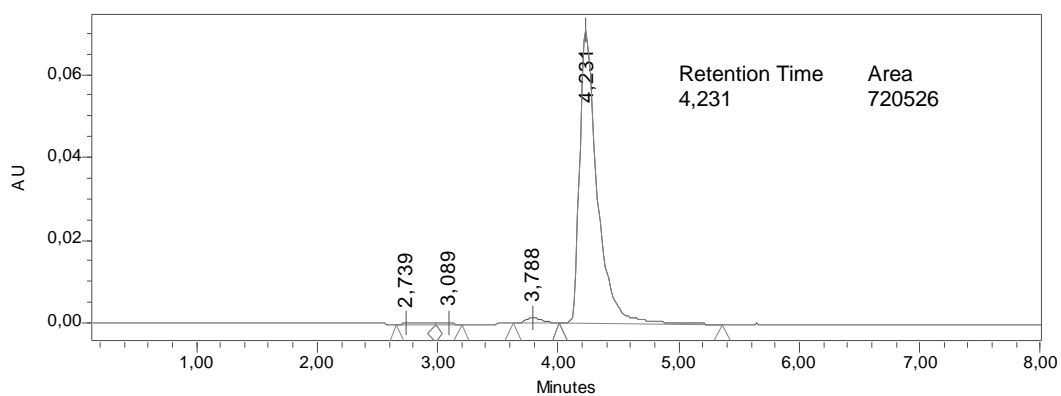


Figure 99 Chromatogramme après élution avec 1 ml d'acétonitrile et dilution x 4

L'expérience a été répétée 3 fois et montre que la valeur moyenne du taux de récupération du 6OHABT est de **95%**.

### Elimination de l'alginate

Un erlenmeyer contenant 13 g de billes d'alginate dans 50 ml d'eau a été mis en agitation pendant 3 jours afin que l'alginate passe partiellement en solution. Nous avons traité 6 ml de cette solution sur une cartouche HLB 6 ml (60 mg de phase). L'élimination de l'alginate est contrôlée étape par étape par RMN  $^1\text{H}$  lors du traitement SPE, les résultats sont présentés **Figure 100** :

- Le spectre acquis avant le traitement montre la présence des signaux de l'alginate sur la zone 3,50 – 5,30 ppm (**spectre 1**).
- L'analyse de la solution récupérée après dépôt, met en évidence la présence d'alginate à hauteur de 80% de la concentration initiale (**spectre 2**).
- Le spectre de la première solution de lavage permet de montrer que 10% de l'alginate ont encore été éliminés (**spectre 3**).
- Un second lavage ne semble pas utile puisque le **spectre 4** ne présente aucun signal relatif à l'alginate.
- Le **spectre 5** a été acquis après élution, aucun signal d'alginate n'est visible.

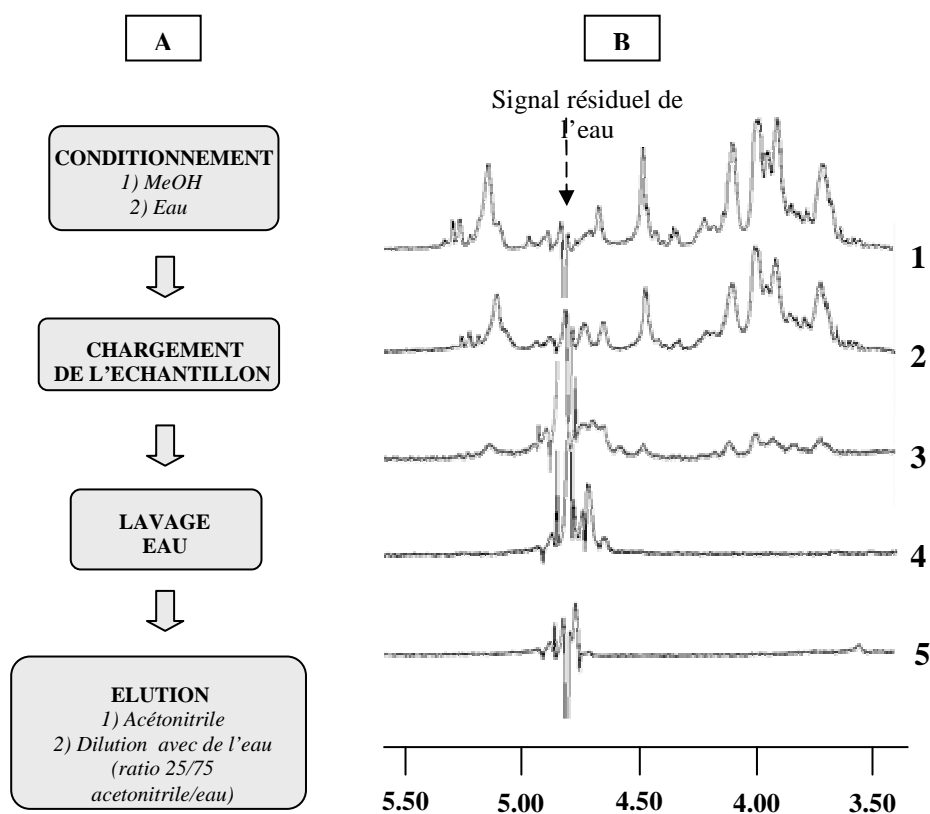


Figure 100 Elimination de l'alginate sur cartouche SPE OASIS® HLB - (A) les différentes étapes de l'extraction (B) spectres RMN acquis après chacune des étapes

### **Vérification des résultats sur un mélange alginate + ABT + 6OHABT**

Le traitement SPE a également été réalisé sur un mélange contenant de l'alginate, de l'ABT ( $C = 0,25 \text{ mM}$ ) et du 6OHABT ( $C = 0,25 \text{ mM}$ ). Après traitement, les taux de récupération sont de 100% pour l'ABT et de 95% pour le 6OHABT.

### **Elimination du fer**

Nous avons regardé ce qu'il advenait du fer lors du traitement SPE pour savoir si les dosages du fer devaient impérativement être faits avant le passage sur cartouche.

#### Dosage du fer total (moyenne sur 3 essais)

avant passage sur  
cartouche

$Abs_{562nm} = 0,0774$

après passage sur  
cartouche

$Abs_{562nm} = 0,0174$

Après 3 essais, les résultats obtenus montrent qu'en moyenne 78 % du fer est éliminé après passage de l'échantillon sur la cartouche. Il est donc impératif de faire les dosages du fer sur les échantillons avant le traitement SPE.

### **I.1.4 Adsorption de l'ABT et du FeNTA sur l'alginate**

Des phénomènes d'adsorption de l'ABT et du FeNTA sur les billes d'alginate peuvent se produire et doivent être pris en compte dans l'interprétation des données. En effet, les billes d'alginate sont des structures macromoléculaires présentant des cavités et des fonctions alcool et acide carboxylique qui peuvent interagir avec certains composés. Les expériences ont été menées avec des billes d'alginate ne contenant pas de bactéries et en absence d'irradiation. Afin de quantifier seulement l'adsorption de l'ABT et celle du FeNTA, les expériences ont été menées indépendamment et avec des concentrations respectives de 0,5 mM et 1 mM. La concentration en ABT dans le milieu d'incubation a été quantifiée par HPLC après traitement SPE, le fer total a été directement mesuré par spectrophotométrie. Les résultats obtenus sont présentés **Tableau 12**.

		Temps (h)							
		T0	0,5	1	2	3	21	77	145
Sans billes d'alginate	ABT (mM)	0,50	0,48	0,48	0,49	0,49	0,48	0,49	0,50
billes d'alginate		0,50	0,46	0,45	0,44	0,44	0,45	0,44	0,44
Sans billes d'alginate	fer total (mM)	1,00	0,82	0,76	0,76	0,76	0,83	0,85	0,79
billes d'alginate		1,00	0,90	0,89	0,88	0,87	0,75	0,78	0,81

Tableau 12 Evolution des concentrations en ABT et en fer au cours du temps dans le milieu d'incubation contenant les billes d'alginate ou les cellules en suspension, de l'ABT (0,5 mM) et du FeNTA (1 mM)

Le **Tableau 12** montre que l'ABT est rapidement adsorbé sur les billes d'alginate : 8% soit 0,04 mM disparaissent du milieu en 30 minutes. Cette adsorption évoluera avec le temps dans les différentes expériences selon notamment la quantité d'ABT dégradée. Ce phénomène est donc difficile à quantifier voilà pourquoi on considérera une adsorption d'ABT de 8 % tout au long de l'expérience tout en sachant que le phénomène sera surestimé.

Quant au fer, aucune adsorption n'est observée. Nous observons cependant qu'avec ou sans billes d'alginate, la concentration en fer diminue de 20%. Ce résultat peut être attribué au phénomène de décomplexation du complexe FeNTA observé pour des  $\text{pH} \geq 7,0$  (Abida, 2005).

## I.2 Comparaison des deux systèmes

La biodégradation de l'ABT avec des cellules en suspension a été comparée à celle obtenue avec des cellules immobilisées et ceci, avec et sans FeNTA. Nous avons également étudié la dégradation de l'ABT en présence du complexe seul, sans bactérie.

### I.2.1 Procédé de biodégradation

Nous avons souhaité comparer à la fois les voies de biodégradation de l'ABT et l'efficacité de chacun des deux systèmes. L'effet de la lumière a également été étudié pour conclure quant à un effet potentiellement protecteur des billes

d'alginate vis-à-vis de la lumière. En effet, les expériences montrent qu'en présence de lumière la dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* est toujours un peu moins importante qu'en absence de lumière.

Le **Tableau 13** montre l'évolution du pourcentage de biodégradation de l'ABT pour les deux systèmes, en présence ou non de lumière. Dans les deux systèmes, la biodégradation de l'ABT est légèrement plus efficace en absence de lumière ce qui montre que les billes d'alginate n'apportent finalement pas de protection aux bactéries. Si nous prenons en considération l'adsorption de l'ABT sur les billes d'alginate (les valeurs entre parenthèses tiennent compte de l'adsorption), nous observons que les taux de dégradation sont du même ordre dans les deux systèmes. Après 100 heures d'incubation, les pourcentages de dégradation sont très proches :

- en présence de lumière, 14% d'ABT sont convertis avec les cellules en suspension et 22% avec les cellules immobilisées
- en absence de lumière, 28% d'ABT sont convertis avec les cellules en suspension et 30% avec les cellules immobilisées

		T0	0,5h	2h	3h	29h	77h	100h
Cellules en suspension	+ hv	0%	12%	14%	12%	12%	16%	14%
	- hv	0%	12%	10%	8%	22%	28%	28%
Cellules immobilisées	+ hv	0%	20% (12%)	16% (8%)	28% (20%)	22% (14%)	24% (16%)	30% (22%)
	- hv	0%	28% (20%)	18% (10%)	26% (18%)	34% (26%)	38% (30%)	38% (30%)

*Tableau 13 Pourcentages de dégradation de l'ABT lors du procédé de biodégradation de l'ABT (0,5 mM) avec ou sans lumière (analyses HPLC) par des cellules en suspension et des cellules immobilisées – NB : les valeurs entre parenthèses sont corrigées et prennent en compte l'adsorption sur l'alginate*

Comme le montre la **Figure 101**, en absence de lumière, nous avons également noté la présence de 6OHABT, nous l'avons peu observée en revanche dans les expériences sous irradiation, en effet, le 6OHABT est photodégradable.

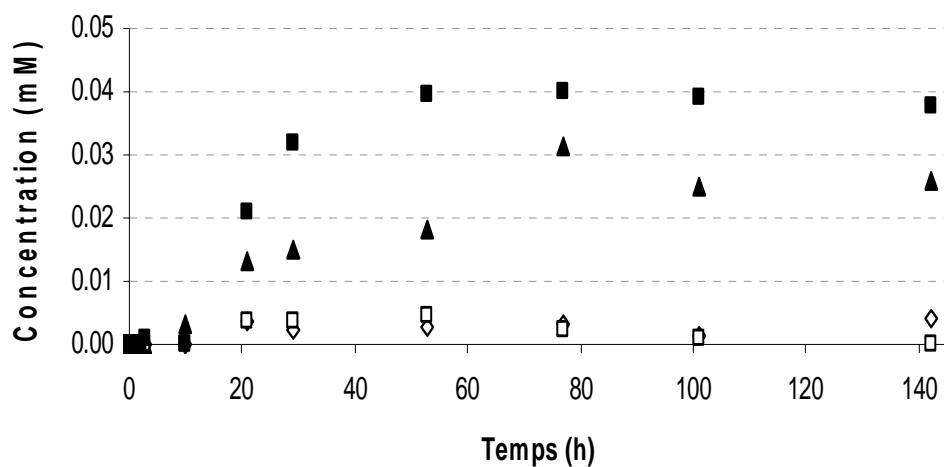


Figure 101 Evolution de la concentration en 6OHABT avec le temps lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM). (Δ) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées - hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres - hv

Nous observons la présence de 4OHABT dans aucun cas.

### I.2.2 Procédé en présence de FeNTA ( $\pm$ lumière)

Nous nous sommes également intéressés à l'effet des billes d'alginate (sans bactéries) sur le processus de photodégradation induit par le complexe FeNTA. Les études ont été menées en présence et en absence de lumière (**Tableau 14**).

		T0	0,5h	2h	3h	29h	77h	100h
solution	+ hv	0%	6%	12%	12%	50%	n.d.	46%
	- hv	0%	3%	2%	2%	3%	3%	0%
billes d'alginate sans bactéries	+ hv	0%	18% (10%)	16% (8%)	20% (12%)	36% (28%)	46% (38%)	46% (38%)
	- hv	0%	9% (1%)	11% (3%)	12% (4%)	9% (1%)	12% (4%)	12% (4%)

Tableau 14 Pourcentages de dégradation de l'ABT lors du procédé de photodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence ou non de billes d'alginate (sans bactérie) (analyses HPLC)– NB : les valeurs entre parenthèses sont corrigées et prennent en compte l'adsorption sur l'alginate

Nous remarquons qu'avec ou sans billes d'alginate (sans bactérie) et en absence de lumière, l'ABT n'est pas dégradé. En effet, si en présence des billes d'alginate les taux de dégradation semblent être d'environ 10% au-delà de 30 minutes, ils sont réellement inférieurs lorsque nous prenons en compte le phénomène d'adsorption (valeurs à considérer entre parenthèses).

Si nous nous intéressons aux expériences irradiées, toujours en prenant en compte le phénomène d'adsorption de l'ABT sur les billes d'alginate, nous observons une dégradation légèrement plus importante en solution. Ainsi, après 100 heures d'incubation, 46% de l'ABT est photodégradé en solution contre 38% en présence de billes d'alginate. Parallèlement à ces observations et comme le montre la Figure 102, les concentrations en 6OHABT augmentent en présence de lumière atteignant une concentration de 0,05 mM et de 0,03 mM respectivement pour le cas sans bille d'alginate et pour le cas avec billes d'alginate.

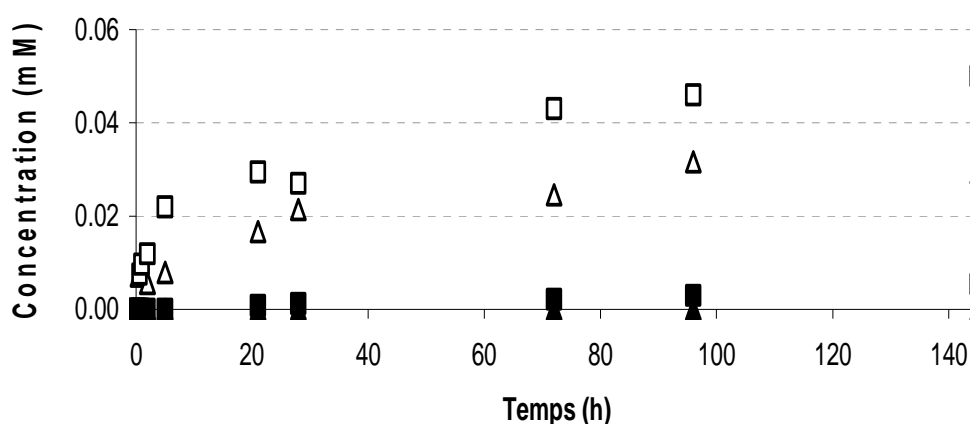


Figure 102 Evolution de la concentration en 6OHABT avec le temps lors de la photodégradation de l'ABT (0,5 mM). ( $\Delta$ ) billes d'alginate + hv ; ( $\blacktriangle$ ) billes d'alginate - hv ; ( $\square$ ) solution + hv ; ( $\blacksquare$ ) solution - hv

La concentration en 4OHABT est nulle pour les expériences non irradiées ; en milieu irradié, elle évolue de manière similaire dans les deux cas comme le montre la Figure 103.



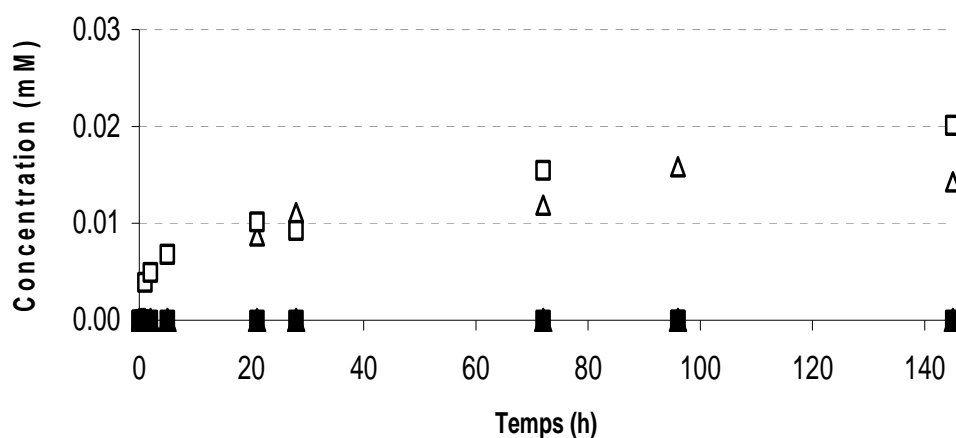


Figure 103 Evolution de la concentration en 4OHABT avec le temps lors de la photodégradation de l'ABT (0,5 mM). (△) billes d'alginate + hv ; (▲) billes d'alginate - hv ; (□) solution + hv ; (■) solution - hv

Une diminution de la quantité de fer soluble est également observée (**Figure 104**), elle s'explique probablement par la décomplexation du FeNTA suivie de la précipitation du fer (Bunescu et al., 2008b). La concentration en fer total après 100 heures d'incubation et en présence de lumière est similaire dans les deux cas, 0,10 mM en solution, 0,11 mM en présence d'alginate. En absence de lumière, les concentrations en fer sont également identiques puisqu'elles sont respectivement de 0,79 mM et de 0,81 mM.

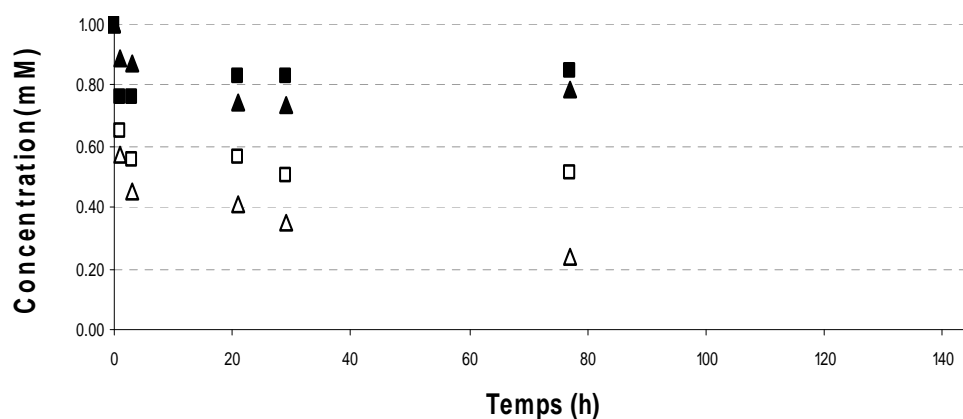


Figure 104 Evolution de la concentration en fer total avec le temps lors de la photodégradation de l'ABT (0,5 mM). (△) billes d'alginate + hv ; (▲) billes d'alginate - hv ; (□) solution + hv ; (■) solution - hv

Nous pouvons donc conclure que la présence d'alginate ne modifie pas les voies de photodégradation de l'ABT puisque nous avons observé les mêmes intermédiaires, ni l'efficacité de ce processus. Ce résultat est important pour comprendre la dégradation de l'ABT par les procédés combinés de bio et de photodégradation que nous allons maintenant détailler.

### I.2.3 Procédés combinés de photo et de biodégradation

Les procédés combinés consistent à travailler avec *R. rhodochrous* et le complexe FeNTA avec ou sans irradiation.

L'effet le plus important observé ici est dû à la présence de FeNTA qui accélère considérablement la dégradation de l'ABT par rapport à celle observée avec les bactéries uniquement (**Figure 105**). La figure montre clairement que quel que soit le système, la lumière n'a aucun effet sur la dégradation de l'ABT.

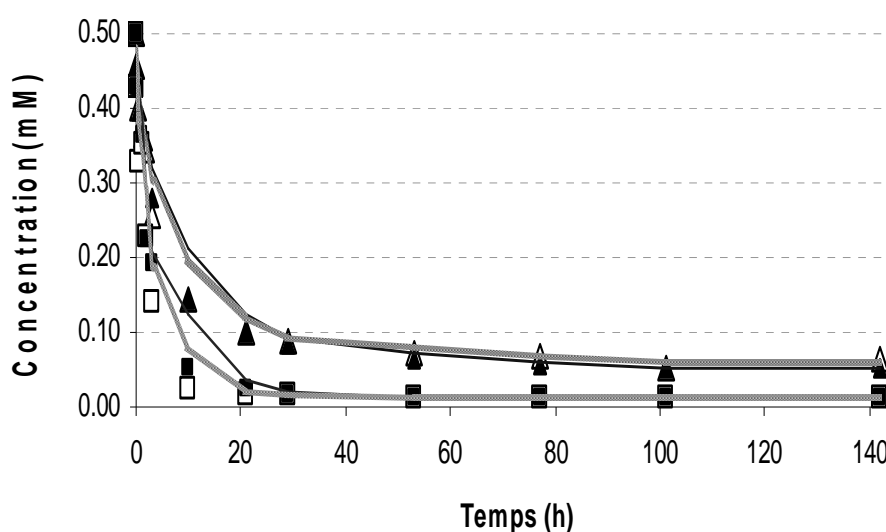


Figure 105 Evolution de la concentration en ABT avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées - hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres - hv  
Rq : les valeurs sont brutes et ne prennent pas en considération l'adsorption sur l'alginate

Après 30 heures d'incubation et en absence de lumière, pour le système avec cellules libres et le système IC<sup>1</sup>, les pourcentages de dégradation de l'ABT sont respectivement :

<sup>1</sup> rappel : Système IC = système avec les cellules immobilisées

- 22% et 26% par biodégradation uniquement
- 3% et 1% en présence de FeNTA uniquement
- 96% et 76% par la combinaison des deux procédés

*Rq : les valeurs considérées ci-dessus prennent en compte le phénomène d'adsorption sur l'alginate.*

L'effet majeur dû au FeNTA, qui avait déjà été observé avec les cellules libres (Bunescu et al., 2008a), est confirmé ici avec les cellules immobilisées. Nous observons cependant que la dégradation de l'ABT est légèrement plus importante lorsque les cellules sont en suspension.

La **Figure 106** montre d'une part des réponses similaires avec ou sans lumière sur la production de métabolites: rapide production de 6OHABT pour les cellules en suspension, atteignant 0,05 mM après 3 heures d'incubation en absence de lumière, suivie d'une disparition complète après 145 heures ; production plus lente avec le système IC, avec une concentration inférieure et une cinétique de disparition ralentie atteignant une valeur de 0,03 mM après 145 heures.

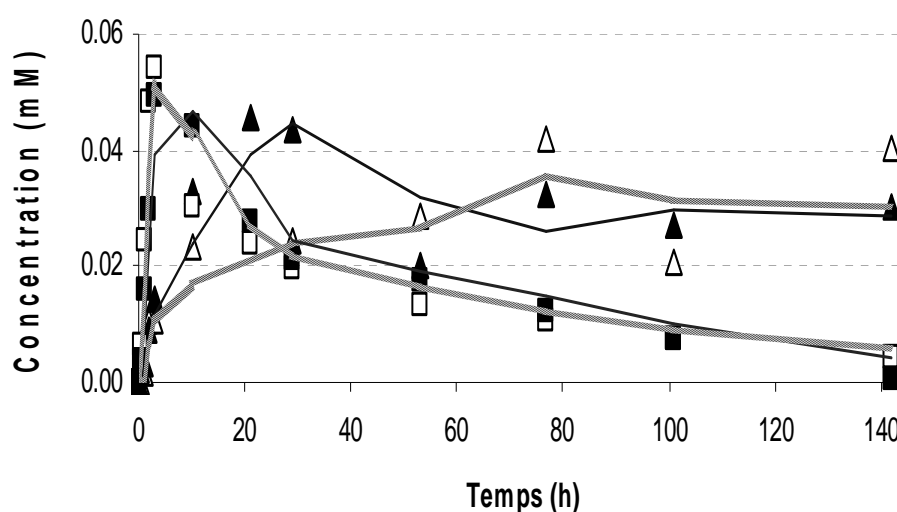


Figure 106 Evolution de la concentration en 6OHABT avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (Δ) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées - hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres - hv

La **Figure 107** qui concerne l'évolution du 4OHABT avec le temps nous donne les mêmes tendances d'évolution. Là aussi, nous observons que les évolutions des courbes sont indépendantes de la présence ou non de lumière.

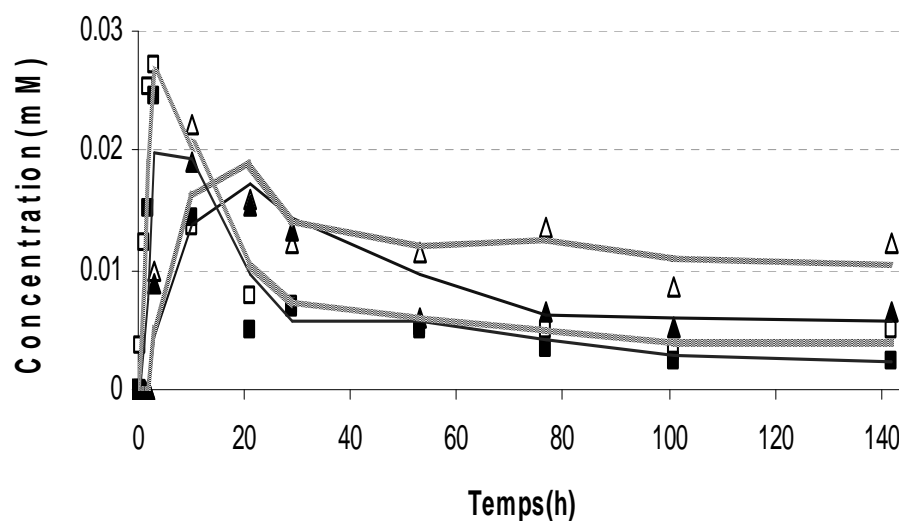


Figure 107 Evolution de la concentration en 4OHABT avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées - hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres - hv

Concernant l'évolution du fer total dans le milieu, la **Figure 108** montre que l'effet de la lumière n'est pas significatif et qu'une diminution régulière de sa concentration avec le temps est observée dans les deux systèmes. Il est à noter d'autre part, que le fer total disparaît plus rapidement dans le cas du système IC alors que dans ce cas-là la dégradation de l'ABT est moins efficace que dans le cas des cellules libres. Après 145 heures d'incubation, il reste en effet dans le milieu 0,08 mM de fer total avec le système IC et 0,37 mM avec les cellules en suspension.

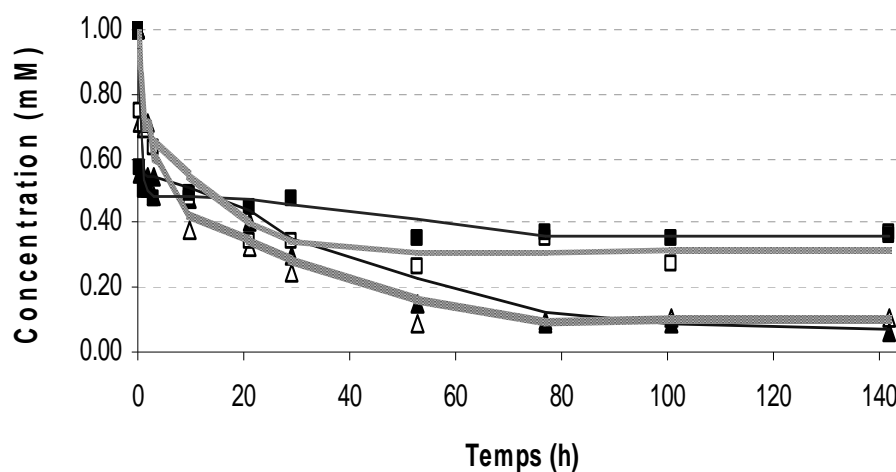


Figure 108 Evolution de la concentration en fer total avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées - hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres - hv

Lors de ces expériences nous avons observé qu'avec le temps les billes d'alginate ont tendance à se désagréger partiellement : les interactions entre les unités du sucre et les cations calcium qui sont responsables de la gélification de l'alginate sont très probablement remplacées par des interactions avec des cations fer. Cet échange de cation rend le fer indisponible et explique d'une part pourquoi nous retrouvons moins de fer total en solution dans les expériences avec alginate (Sreeram et al., 2004) et d'autre part, une dégradation un peu moins efficace est observée lorsque les cellules sont immobilisées.

### **I.3 Estimation du taux de minéralisation de l'ABT lors des procédés de biodégradation**

Afin de connaître le taux de minéralisation de l'ABT lors des processus de biodégradation, nous avons mesuré la concentration en Carbone Organique Total (TOC) au cours de trois expériences :

- 1) une première expérience témoin : bactéries seules en absence d'ABT. Ce témoin était en effet nécessaire car les cellules relarguent des composés carbonés de leur métabolisme propre.
- 2) la seconde expérience est celle des bactéries incubées avec l'ABT (0,5 mM)
- 3) la troisième expérience est celle des bactéries incubées avec l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM)

Ces expériences ont été réalisées avec des cellules libres car la présence d'alginate aurait complexifié l'interprétation des résultats en apportant une quantité importante de carbone.

Avant d'accéder aux valeurs de carbone organique total, nous mesurons les concentrations en carbone total et en carbone inorganique; c'est ensuite par différence que nous déterminons les valeurs de TOC. Ainsi, les **Figure 109** et **Figure 110** présentent respectivement les concentrations en carbone total et en carbone inorganique dans les trois expériences décrites ci-dessus.

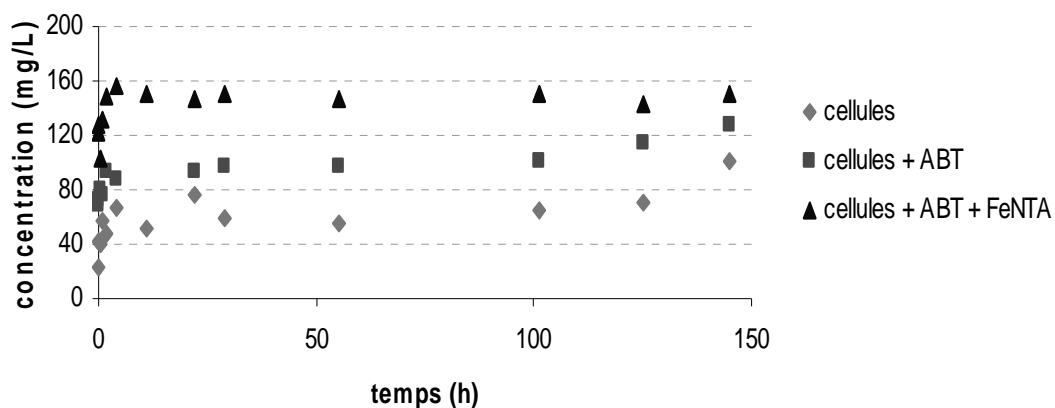


Figure 109 Evolution de la concentration en carbone total lors des incubations (◆) avec cellules seules, (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1mM)

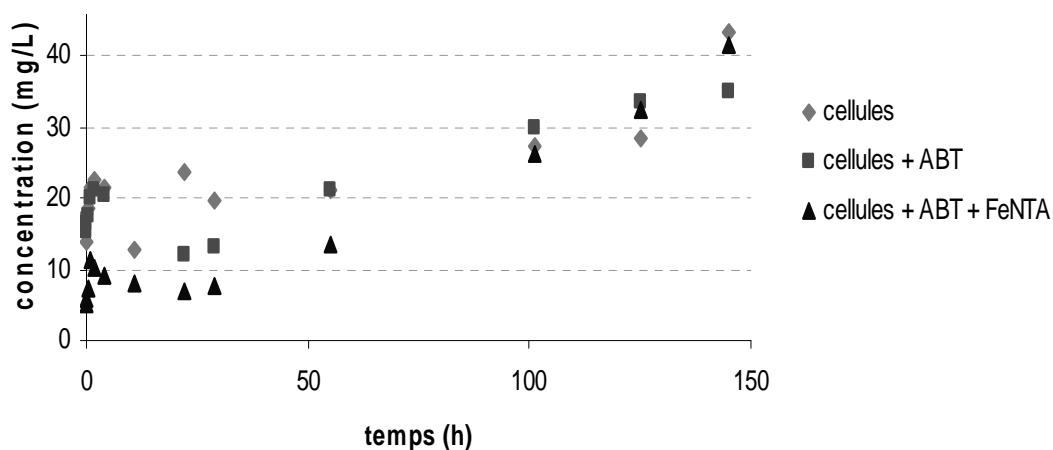


Figure 110 Evolution de la concentration en carbone inorganique lors des expériences (◆) avec cellules seules, (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM)

La **Figure 111** présente l'évolution en fonction du temps de la concentration en carbone organique total lors des trois expériences. Nous avons ensuite soustrait aux deux expériences de biodégradation de l'ABT, la quantité de carbone apportée par les cellules (expérience témoin), c'est ce qu'illustre la **Figure 112**.

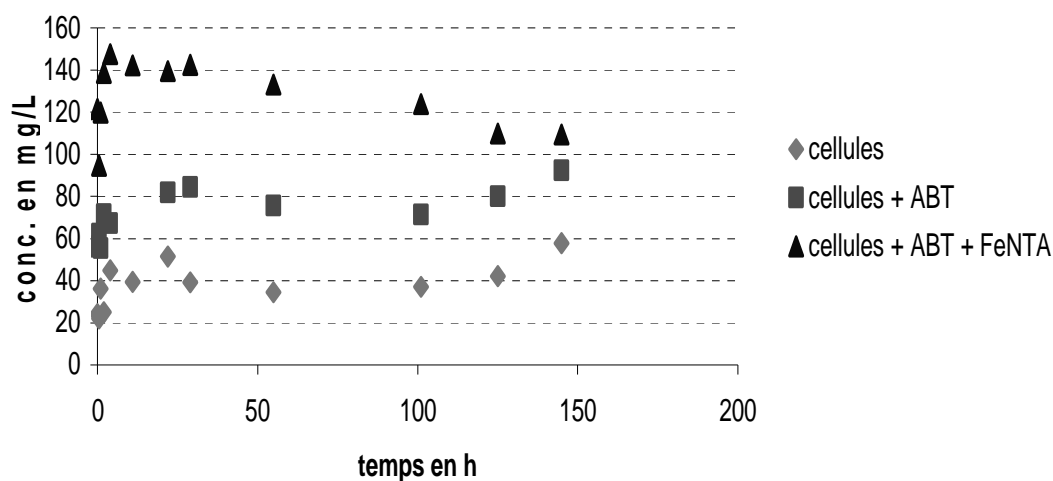


Figure 111 Evolution de la concentration en carbone organique total lors des expériences (◆) avec cellules seules, (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM)

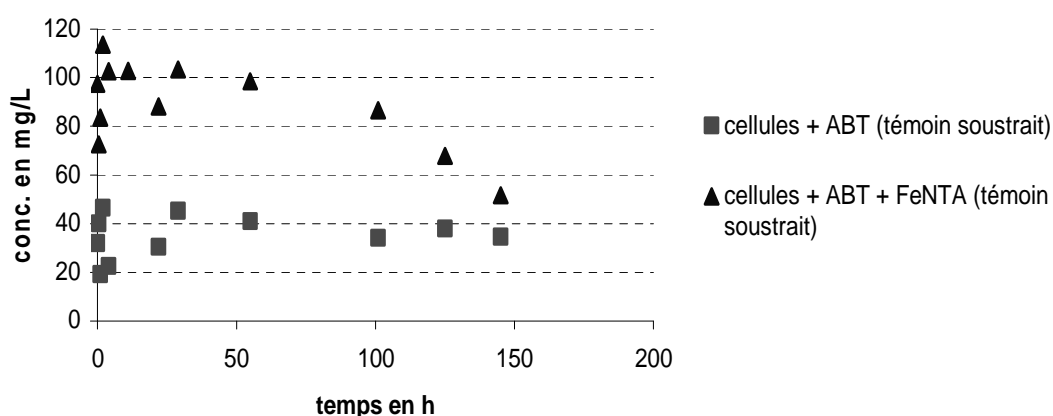


Figure 112 Evolution de la concentration en carbone organique total prenant en compte le témoin cellules lors des expériences (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM)

Ces expériences ont été suivies en parallèle par HPLC et par RMN  $^1\text{H}$  pour déterminer les concentrations en ABT, en FeNTA et en leurs métabolites. Des travaux antérieurs (Bunescu et al., 2008b) ont montré que le FeNTA était transformé en IDA (acide iminodiacétique), en formiate et en glycine. Ces mesures nous ont donné la répartition du carbone et ainsi permis d'estimer la minéralisation de l'ABT lors des procédés de biodégradation. Les valeurs sont présentées dans la **Tableau 15**.

A	[ABT]		[6OHABT]		TOC mg/L	
	mM	mg/L	mM	mg/L	Calculated value	Measured value
t = 0 h	0.50	42.0	0.00	0.00	42.0	44.9
t = 145 h	0.30	25.2	0.08	6.7	31.9	34.6

B	[ABT]		[FeNTA]		[IDA]		[Gly]		TOC mg/L	
	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	Calc. value	Meas. value
t = 0 h	0.50	42.0	1.00	72.0	0.00	0.0	0.00	0.0	124	114.0
t = 145 h	0.00	0.0	0.00	0.0	0.11	5.28	0.29	6.96	12.24	51.6

Tableau 15 Concentrations mesurées par RMN <sup>1</sup>H et par HPLC, valeurs des TOC des expériences (A) en présence d'ABT (0,5 mM), (B) en présence d'ABT (0,5 mM) et de FeNTA (1 mM)

### I.3.1 Biodégradation de l'ABT en absence de FeNTA

Le **Tableau 15A** rassemble les valeurs de TOC déterminées aux temps t = 0 et t = 145 heures pour l'expérience de biodégradation de l'ABT avec les bactéries seules. Nous remarquons que la concentration en carbone déterminée à partir des différents composés organiques identifiés dans le milieu et la concentration en carbone organique déterminée par TOC sont en accord. Ainsi l'ABT est transformé en 6OHABT entre autre mais aucune minéralisation n'a lieu.

### I.3.2 Biodégradation de l'ABT en présence de FeNTA

Le **Tableau 15B** présente les valeurs des concentrations en ABT, FeNTA, IDA, glycine ainsi que les valeurs des TOC, mesurées aux temps t = 0 et t = 145 heures pour l'expérience de biodégradation de l'ABT avec les bactéries et en présence de FeNTA.

Au temps t = 0, les valeurs de TOC calculées et les valeurs de TOC mesurées sont en accord. Au temps t = 145 heures, le bilan n'est pas correct puisqu'environ 39 mg de carbone ne sont pas identifiés. Le chromatogramme HPLC et le spectre RMN <sup>1</sup>H montrent qu'il n'y a plus ni de 6OHABT, ni de 4OHABT, ceux-ci ayant été dégradés par les bactéries. Par ailleurs, une étude antérieure



(Bunescu et al., 2008a) a suggéré l'existence d'un complexe Fe-catéchol comme intermédiaire de biodégradation qui pourrait être ouvert par des 2,3-catéchol dioxygénases présentes chez *R. rhodochrous*. Aucun composé aromatique n'a été détecté par RMN  $^1\text{H}$ , ni par HPLC indiquant que la structure benzothiazole a disparu et que l'ABT a été partiellement minéralisé. La difficulté est d'évaluer la minéralisation du FeNTA, d'abord parce qu'un large pic apparaît après 11 heures (voir **Figure 113**) et comme la structure de ce composé n'est pas connue, il nous est impossible de déterminer sa contribution en carbone. Seconde difficulté rencontrée, nous savons que du glyoxilate est produit lors de la dégradation du FeNTA (Bunescu et al., 2008b), malheureusement ce composé ne peut être quantifié par RMN  $^1\text{H}$  puisqu'il ne contient aucun atome d'hydrogène. La troisième incertitude concerne quelques signaux de faible intensité qui résonnent entre 2,0 et 2,4 ppm et aux alentours de 2,8 ppm. Ils correspondent à des métabolites bactériens qui contribuent donc également au TOC mesuré mais il nous est impossible de quantifier cette contribution ignorant la structure des composés impliqués.

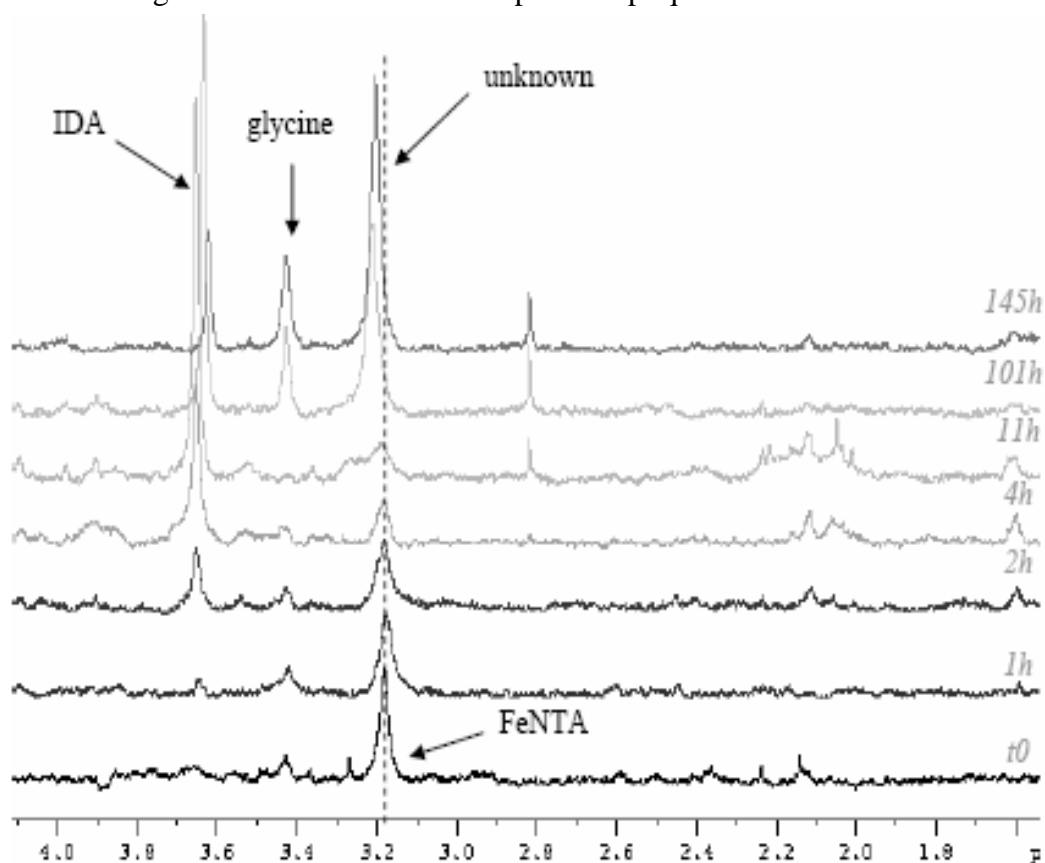


Figure 113 Spectres de RMN  $^1\text{H}$  illustrant l'évolution en fonction du temps des métabolites du FeNTA lors de l'incubation des bactéries avec l'ABT (0,5 mM) et le complexe FeNTA (1 mM)

## I.4 Etude du recyclage des deux systèmes

Nous avons évalué les capacités de réutilisation des deux systèmes. Pour cela, nous avons effectué 3 cycles de 72 heures dans le milieu ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM), en présence de lumière. Entre chaque cycle, les cellules sont récupérées après centrifugation pour les cellules en suspension et après simple passage sur tamis pour les cellules immobilisées et lavées deux fois avec une solution de NaCl 8%.

### Dégradation de l'ABT au cours des cycles

La **Figure 114** présente les cinétiques de dégradation de l'ABT lors des 3 cycles. L'expérience témoin correspondant au processus d'adsorption (ABT + FeNTA + billes d'alginate sans cellules) montre un pourcentage identique de disparition au cours des 3 cycles.

- Les cinétiques obtenues lors du **cycle 1** sont habituelles : après 72 heures d'incubation, l'ABT est dégradé à hauteur de 100% pour le système classique et de 80% (adsorption prise en compte) pour le système IC.

- Lors du **cycle 2**, les cinétiques sont beaucoup plus lentes et les taux de dégradation beaucoup plus faibles. Ainsi après 72 heures d'incubation l'ABT est dégradé à hauteur de 30% pour le système classique et de 22% (adsorption prise en compte) pour le système IC.

- Les cinétiques de dégradation du **cycle 3** restent faibles, les taux de dégradation après 72 heures sont similaires dans les deux systèmes : 24% de dégradation pour le système classique, 22% (adsorption prise en compte) de dégradation pour le système IC.

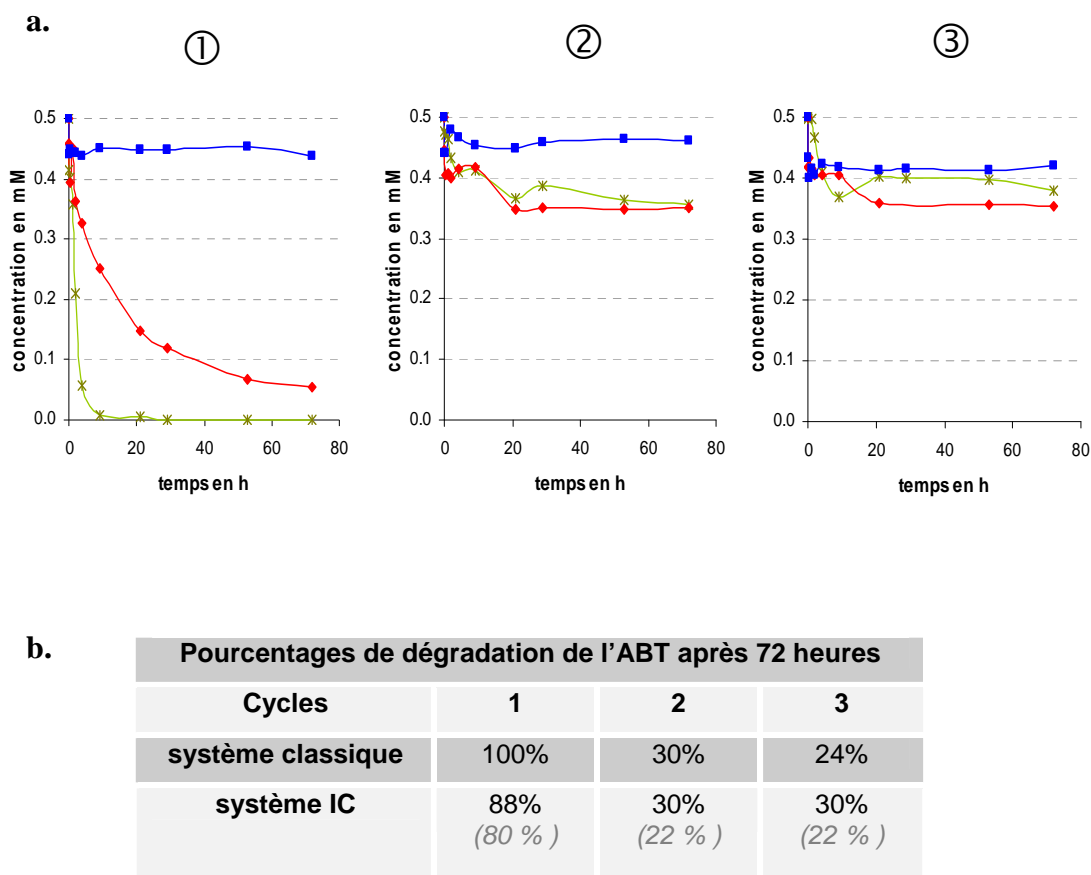


Figure 114 a. Cinétiques de dégradation de l'ABT sur 3 cycles de 72 heures. (X) ABT + FeNTA + cellules en suspension ; (♦) ABT + FeNTA + cellules immobilisées ; (■) ABT + FeNTA + billes  
Rq : Le phénomène d'adsorption sur l'alginate représenté par la courbe (■), n'est pas pris en compte dans la courbe ABT + FeNTA + cellules immobilisées

b. Pourcentages de dégradation de l'ABT après 72 heures dans les deux systèmes. Les valeurs prenant en compte l'adsorption sont mentionnées entre parenthèses

### Evolutions de la concentration en 6OHABT au cours des cycles

La **Figure 115** présente l'évolution de la concentration en 6OHABT au cours du temps.

- Les évolutions des concentrations lors du **cycle 1** sont celles escomptées. La production de 6OHABT est très rapide avec les cellules en suspension et atteint un maximum d'environ 0,08 mM après 2 heures d'incubation puis diminue rapidement jusqu'à atteindre une valeur de 0,02 mM après 72 heures.

Dans le cas du système IC, la production de 6OHABT est plus lente ainsi que sa disparition ; après 72 heures d'incubation, il en reste 0,04 mM dans le milieu.

- Les évolutions des concentrations en 6OHABT sont semblables pour les deux systèmes dans le **cycle 2** mais les valeurs sont plus faibles dans le système IC. Pour le système IC, la cinétique de production est identique à celle du cycle 1 alors que nous observons une cinétique ralentie pour le cas du système en suspension.

- Dans le cas du **cycle 3**, les cinétiques sont très ralenties dans les deux cas et les concentrations en 6OHABT restent faibles, ce qui est la conséquence d'un taux de dégradation de l'ABT plus faible.

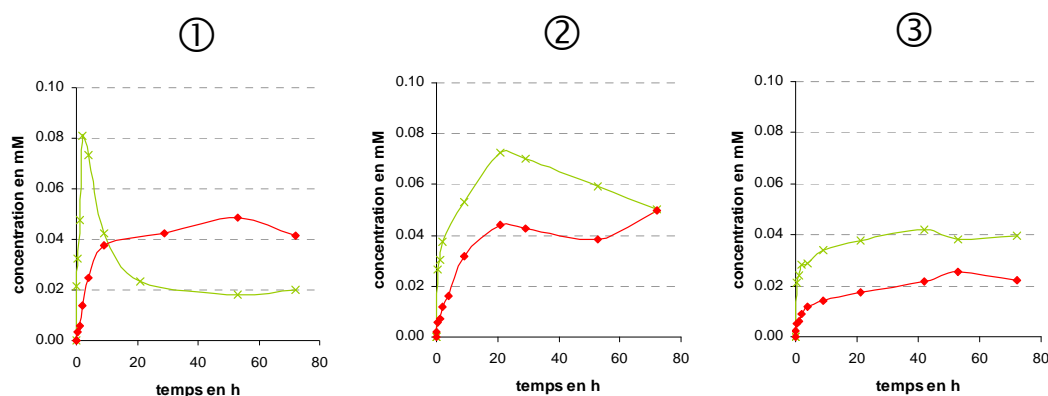


Figure 115 Concentrations en 6OHABT au cours de 3 cycles de 72 heures. (x) ABT + FeNTA + cellules en suspension ; (♦) ABT + FeNTA + cellules immobilisées

## Evolutions de la concentration en 4OHABT au cours des cycles

La **Figure 116** présente les cinétiques de production et de disparition du métabolite 4OHABT.

- Les concentrations en 4OHABT dans le **cycle 1** sont celles que nous attendions. Ainsi cette concentration atteint rapidement un pic à 0,041 mM puis diminue rapidement jusqu'à 0,006 mM après 72 heures d'incubation dans le cas des cellules en suspension. Pour le système IC, la production de 4OHABT se fait plus lentement atteignant une concentration maximale dans le milieu de 0,022 mM puis disparaît progressivement jusqu'à 0,012 mM après 72 heures.

- Dans le **cycle 2**, la production de 4OHABT est ralentie dans le cas du système avec cellules en suspension, elle est inchangée pour le système IC.
- Dans le **cycle 3**, nous observons encore un ralentissement de la cinétique de production du 4OHABT dans le cas des cellules en suspension, sa concentration n'excédant jamais cette fois-ci 0,020 mM. Dans le cas du système IC la cinétique est restée la même au cours des 3 cycles.

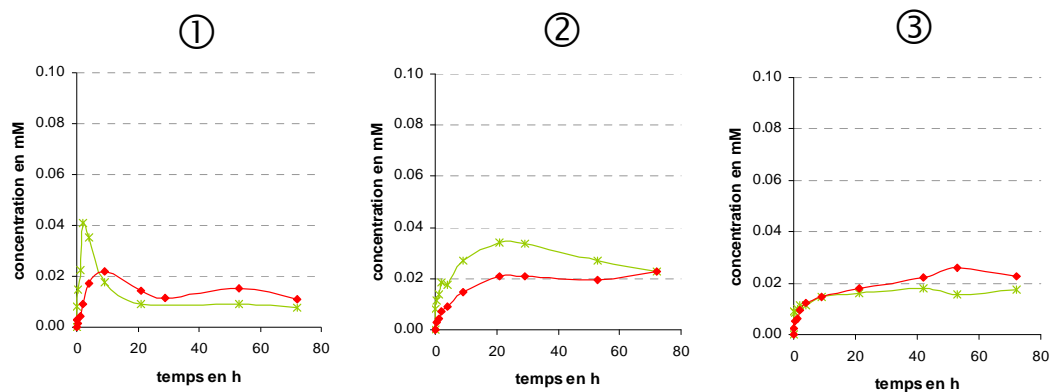


Figure 116 Concentrations en 4OHABT au cours de 3 cycles de 72 heures. (x) ABT + FeNTA + cellules en suspension ; (♦) ABT + FeNTA + cellules immobilisées

Nous pouvons donc en conclure que dans les conditions qui sont les nôtres, les deux systèmes perdent de leur efficacité au cours des cycles et présentent très vite peu d'intérêt. Il est cependant à noter qu'au troisième cycle, l'efficacité des deux systèmes est semblable. Une explication potentielle à cette observation est la perte de cellules lors des centrifugations successives. Certaines bactéries peuvent en effet rester dans le surnageant et donc être jetées de manière involontaire. Il reste ainsi moins de cellules dans le milieu frais ce qui peut être à l'origine d'une dégradation plus lente. Ce phénomène est bien moins observé dans le cas des cellules immobilisées car encapsulées à l'intérieur de billes d'alginate macroscopiques, elles sont plus facilement manipulables.

Ces expériences n'ont pas donné de résultats encourageants. Cela étant, il serait intéressant de tester d'autres conditions. Tout d'abord, nous pourrions travailler non pas avec des cellules au repos mais avec des cellules en croissance. Pour cela, nous pourrions soit ajouter au milieu d'incubation une source de carbone

et une source de phosphore, soit placer les cellules dans un milieu riche entre les cycles. Nous avons d'autre part remarqué qu'au cours du temps, les billes d'alginate se désagrégeaient, voilà pourquoi il serait intéressant de reproduire les expériences en rinçant les billes non pas avec du NaCl mais avec du  $\text{CaCl}_2$ . De cette manière, les cations  $\text{Ca}^{2+}$  pourraient remplacer les cations  $\text{Fe}^{2+}$  dans les billes ce qui permettrait de conserver la structure de billes d'alginate.

## I.5 Conclusions

Dans cette partie, nous avons comparé la dégradation de l'ABT par des cellules libres et par des cellules immobilisées dans une matrice d'alginate. Le premier résultat important obtenu est d'origine qualitative : les voies de dégradation de l'ABT sont les mêmes dans les deux systèmes. Les mêmes intermédiaires métaboliques ont effectivement été trouvés. Il s'agit du 6OHABT et du 4OHABT pour les procédés de photodégradation et de photobiodégradation, et du 6OHABT seulement pour le procédé de biodégradation. En prenant en compte le processus d'adsorption de l'ABT sur l'alginate, une efficacité comparable des deux systèmes avec un léger ralentissement dans le cas du système immobilisé a été observée. Nous savons d'ores et déjà que cette petite différence n'est pas due au phénomène de co-métabolisme puisque nous avons montré que les bactéries n'utilisent pas l'alginate comme source de carbone. Nous avons par ailleurs montré, grâce à la RMN *in vivo* du  $^{31}\text{P}$ , que les cellules libres et les cellules immobilisées ont le même état énergétique, ce qui montre l'absence d'effet néfaste dû à l'encapsulation sur le métabolisme de *R. rhodochrous*. Par conséquent, cette diminution de la cinétique de dégradation de l'ABT dans le cas du système IC peut être liée à une moins bonne diffusion du xénobiotique à travers la matrice d'alginate. Il est également possible que le fer ait remplacé le calcium dans la matrice d'alginate (Min et Hering, 1998 ; Sreeram et al., 2004), limitant alors son utilisation par la bactérie et donc l'activation des enzymes de dégradation. Tous ces résultats montrent que les mécanismes observés pour les bactéries en suspension peuvent être extrapolés aux bactéries immobilisées.

Ce résultat est très important si l'on se place d'un point de vue environnemental car les microorganismes sont rarement sous forme planctonique mais immobilisés soit dans des biofilms, soit dans des floccs.

## II ETUDE RMN *IN VIVO* $^{31}\text{P}$ ET $^{13}\text{C}$ DU METABOLISME ET DU COMPORTEMENT DE *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* DURANT LES PROCEDES DE PHOTO-BIODEGRADATION

Lors des expériences de photo-biodégradation, *R. rhodochrous* est en présence de plusieurs composés potentiellement toxiques comme l'ABT, ses métabolites, des photoproduits et des radicaux, ce qui nous a conduit à étudier le métabolisme énergétique de cette bactérie sous ces différentes conditions de stress.

La RMN *in vivo*, comme nous l'avons déjà vu dans la Partie Bibliographie, permet de suivre en temps réel et avec le même échantillon, l'état métabolique de microorganismes vivants (Grivet et Delort, 2008). Cette approche évite de travailler sur des extraits pour lesquels une partie de l'information peut être perdue notamment à propos des macromolécules comme le glycogène et les polyphosphates.

La RMN *in vivo* du  $^{13}\text{C}$ , particulièrement lorsqu'elle est couplée à l'utilisation de substrats marqués, est très utilisée pour la détermination des voies métaboliques du carbone. Cette technique a été très largement utilisée pour étudier le métabolisme microbien (Grivet et Delort, 2008). Il est à noter cependant, que le métabolisme du carbone des bactéries isolées de l'environnement a été très peu étudié à l'exception des microorganismes issus des stations de traitement des eaux (Lemos et al., 2003 ; 2007) et des bactéries halophiles (Oren et Mana, 2003). Il n'existe aucune donnée à propos des souches du genre *Rhodococcus*.

La RMN *in vivo* du  $^{31}\text{P}$  permet de quantifier les signaux de différents marqueurs énergétiques tels que le pH intracellulaire, l'ATP et les polyphosphates.

Dans ce travail, la RMN *in vivo* du  $^{31}\text{P}$  et celle du  $^{13}\text{C}$  ont été utilisées en vue de deux objectifs :

- le premier est de collecter des informations sur le métabolisme du carbone et du phosphore de *R. rhodochrous* OBT18 dans différentes conditions d'incubation ( $\text{O}_2$ , glucose, phosphate...)
- le second est d'étudier le comportement métabolique de la bactérie lors des procédés de dégradation

## II.1 Etude du métabolisme de *R. rhodochrous* OBT18

Dans cette partie, toutes les expériences de RMN ont été réalisées sans lumière, à Clermont-Ferrand (conditions 2, voir partie Matériel et Méthodes). Nous avons travaillé soit avec les cellules immobilisées, soit avec les cellules en suspension puisqu'il a été clairement prouvé (**Figure 92**) qu'il n'y avait sur les spectres aucune différence, ni qualitative, ni quantitative, entre les deux systèmes. Les expériences ont été menées avec les cellules encapsulées dans l'alginate pour les études de RMN du  $^{31}\text{P}$ ; les billes sont confinées dans la zone d'analyse du spectromètre ce qui permet de concentrer les signaux en composés phosphorés et d'obtenir des spectres de meilleure qualité. Les études de RMN du  $^{13}\text{C}$  ont, quant à elles, été réalisées avec les cellules libres car la présence d'alginate, macromolécule carbonée, aurait largement complexifié les spectres.

### II.1.1 Etude RMN *in vivo* du $^{31}\text{P}$ du métabolisme énergétique

Nous avons enregistré des spectres de RMN *in vivo* du  $^{31}\text{P}$  de *R. rhodochrous* encapsulées dans les billes d'alginate, dans l'eau minérale, sans source de carbone ni de phosphore additionnelles. Un spectre témoin a été acquis au début de l'expérience (voir **Figure 118**, spectre indexé « Control »), il nous a permis de déterminer le pH intracellulaire qui était alors de 6,9 d'après la courbe de titration **Figure 62**. Nous avons soumis les bactéries à différentes conditions et observé ou non des changements au niveau des marqueurs métaboliques. Parmi ces différentes conditions, l'anoxie (ou anaérobiose) a été étudiée chez *R. rhodochrous* car la bactérie est aérobie stricte, l'addition de glucose (10 mM) et celle de phosphate de sodium (400  $\mu\text{M}$ ). Les spectres enregistrés sont présentés **Figure 118**.

Nous retrouvons sur les spectres, le signal de la référence MDP ( $\delta = 16,38$  ppm), ceux des sucres phosphates (fructose-1,6-phosphate, fructose-6-phosphate, glucose-6-phosphate...,  $\delta$  entre 3,7 et 4,9 ppm), celui du Pi ( $\delta = 2,4$  ppm), les signaux du  $\beta$ -ADP ( $\delta = -6,7$  ppm) et du  $\gamma$ -ATP ( $\delta = -5,6$  ppm) qui sont tous deux superposés, les signaux de l' $\alpha$ -ATP ( $\delta = -10,3$  ppm), de l' $\alpha$ -UDPG ( $\delta = -11,2$  ppm), du NADPH ( $\delta = -11,2$  ppm) et du  $\beta$ -UDPG ( $\delta = -12,7$  ppm) qui sont tous trois mal résolus du fait de leur chevauchement, le signal du  $\beta$ -ATP ( $\delta = -19,3$  ppm) et celui des polyphosphates ( $\delta = -22,5$  ppm). Nous observons également un signal important



à  $\delta = -1,6$  ppm (indexé X). Nous avons remarqué que ce signal variait en fonction des conditions d'incubation, notamment, il augmente brutalement en absence d'oxygène. Compte tenu de son déplacement chimique, nous avons pensé en premier lieu qu'il s'agissait d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) ou de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) mais les spectres de ces deux composés commerciaux ont été acquis et ont montré des constantes de couplage  $J_{H-^{31}P}$  différentes (**Figure 117**). Nous n'avons pas à ce jour identifié ce métabolite.

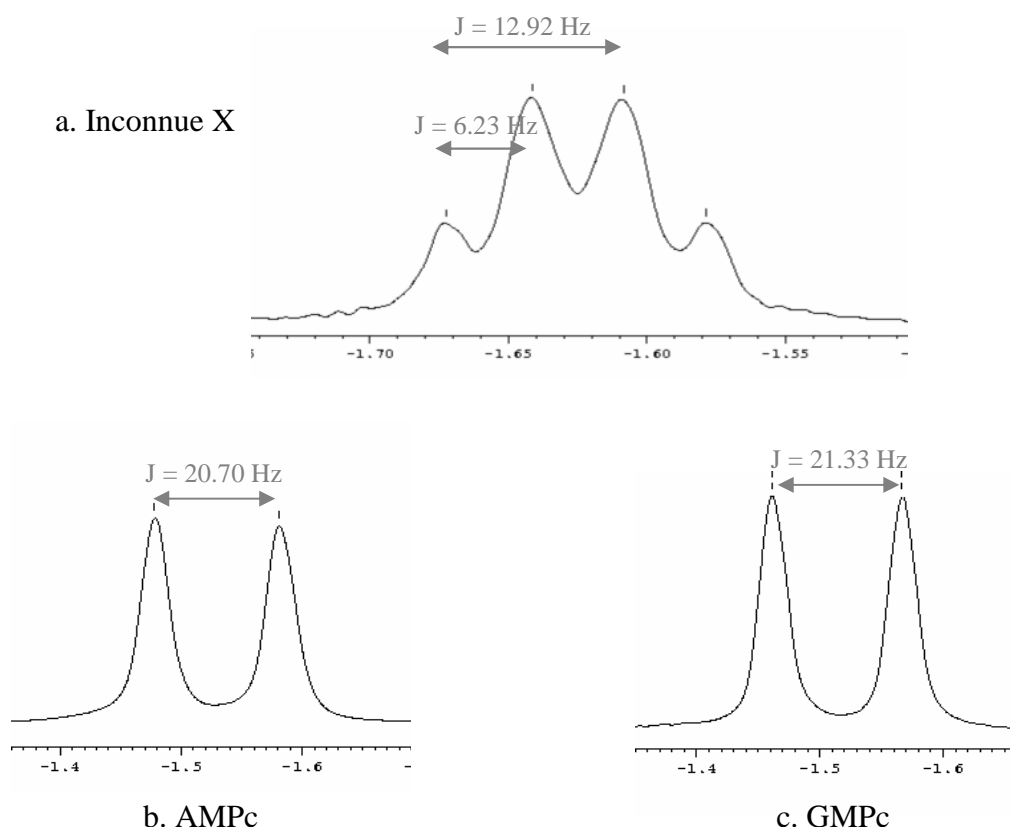


Figure 117 Spectres de RMN  $^{31}P$  non découplés  $^1H$  (a) du composé non identifié X, (b) de l'AMPc, (c) du GMPc

Les polyphosphates détectés par RMN du  $^{31}P$  sont uniquement ceux ayant des chaînes courtes. En effet, lorsque les chaînes sont trop longues, elles sont moins mobiles et présentent un temps de relaxation transversale T2 court ; la largeur du signal étant inversement proportionnelle à T2, cela génère des signaux larges, si larges qu'ils ne peuvent être distingués de la ligne de base devenant donc indétectables.

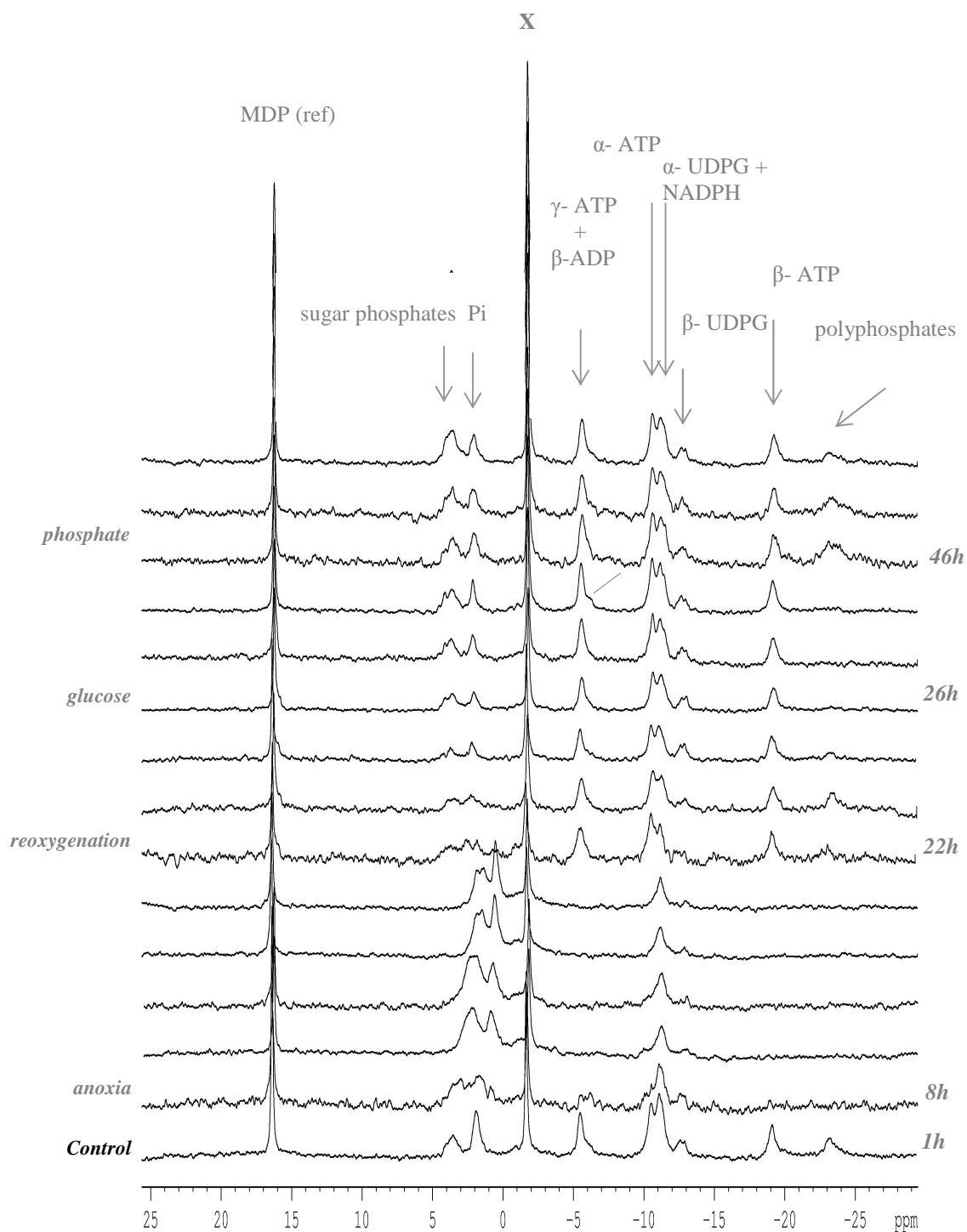
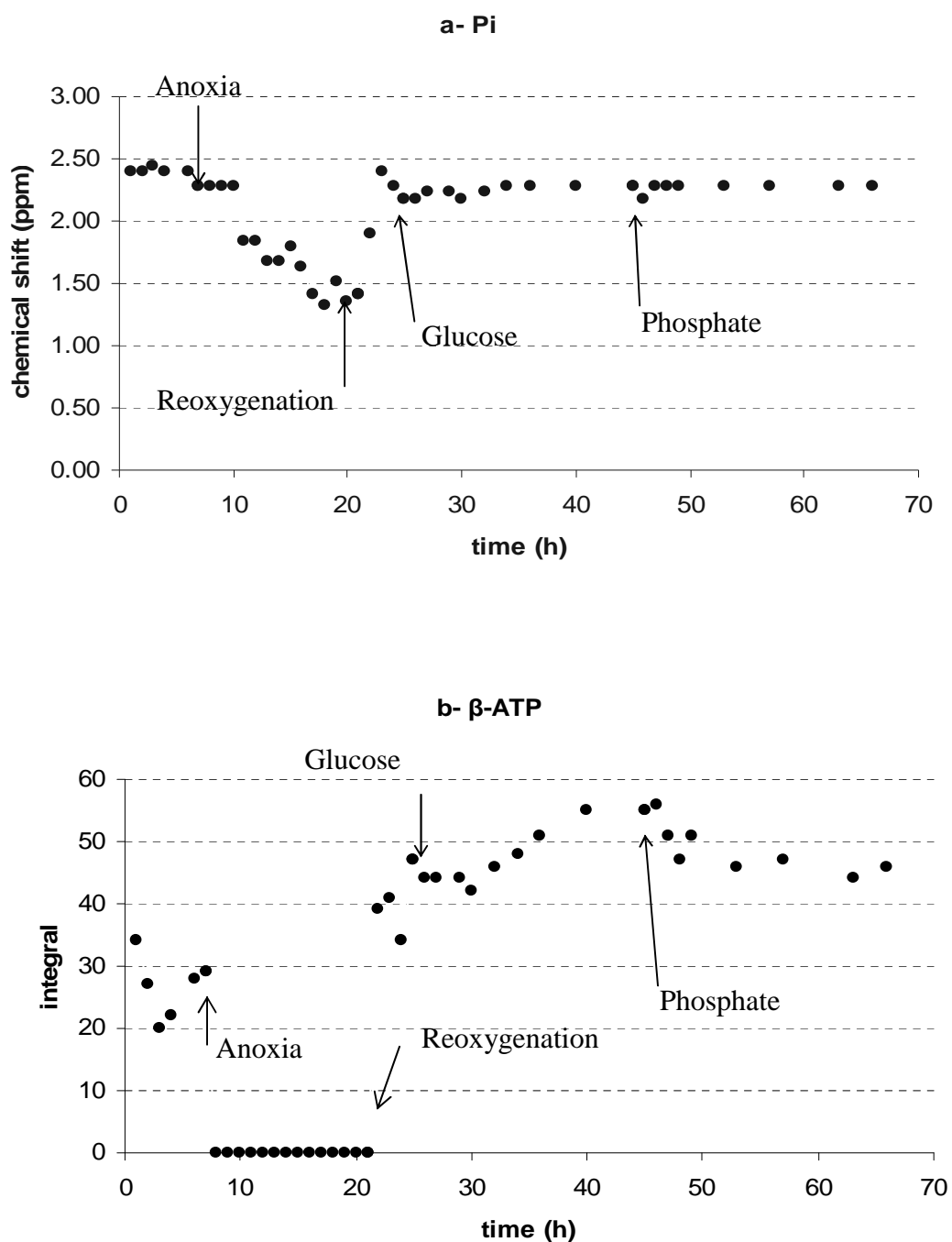


Figure 118 Spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  acquis in vivo sur *R. rhodochrous* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium et soumises à diverses conditions

Les évolutions du déplacement chimique du Pi et des valeurs des intégrales du  $\beta$ -ATP et des polyphosphates sont présentées sur les graphiques de la **Figure 119**.



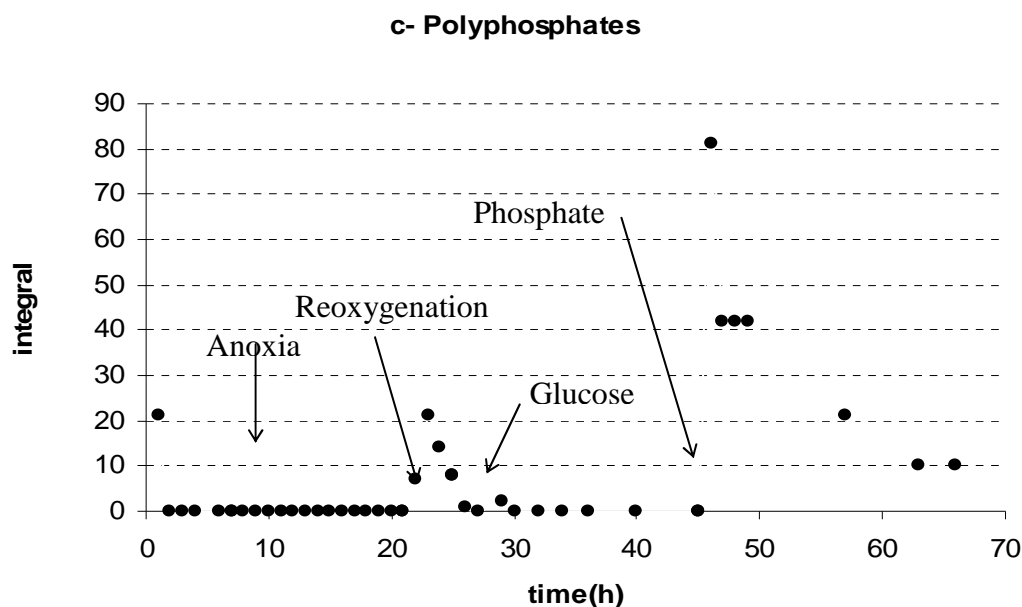


Figure 119 Evolutions de différents marqueurs de l'énergétique cellulaire de *R. rhodochrous* lorsqu'elle est soumise à différentes conditions. (a) évolution du déplacement chimique du  $P_i$  ; (b) évolution des valeurs des intégrales du  $\beta$ -ATP ; (c) évolution des valeurs des intégrales des polyphosphates

### Effet de l'anoxie

Avant la coupure d'oxygène (remplacement de l' $O_2$  par  $N_2$ ), le système est resté 5 heures dans des conditions classiques pour atteindre l'équilibre du système.

La **Figure 120** schématise le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Lorsque la cellule n'est plus alimentée en oxygène, le complexe C IV ne fonctionne plus et n'assure plus la sortie de protons de la cellule. Le pH intracellulaire s'acidifie. Pour compenser ce déséquilibre de gradient de pH, le complexe C V se met à fonctionner dans le sens de la sortie de protons. Ainsi l'ATPase consomme plus d'ATP libérant du  $P_i$ , marqueur du pH intracellulaire. La **Figure 118** confirme cette hypothèse et met en évidence des changements significatifs : le déplacement chimique du signal du  $P_i$  diminue de plus d'une unité en 10 heures ce qui correspond à une diminution du pH intracellulaire de 7,7 à 6,7 (**Figure 119a**). Le  $\beta$ -ATP est consommé instantanément (**Figure 119b**). Le signal des polyphosphates (**Figure 119c**) n'est toujours pas visible car les chaînes se sont allongées du fait de la présence de  $P_i$  additionnel provenant de la dégradation de l'ATP.

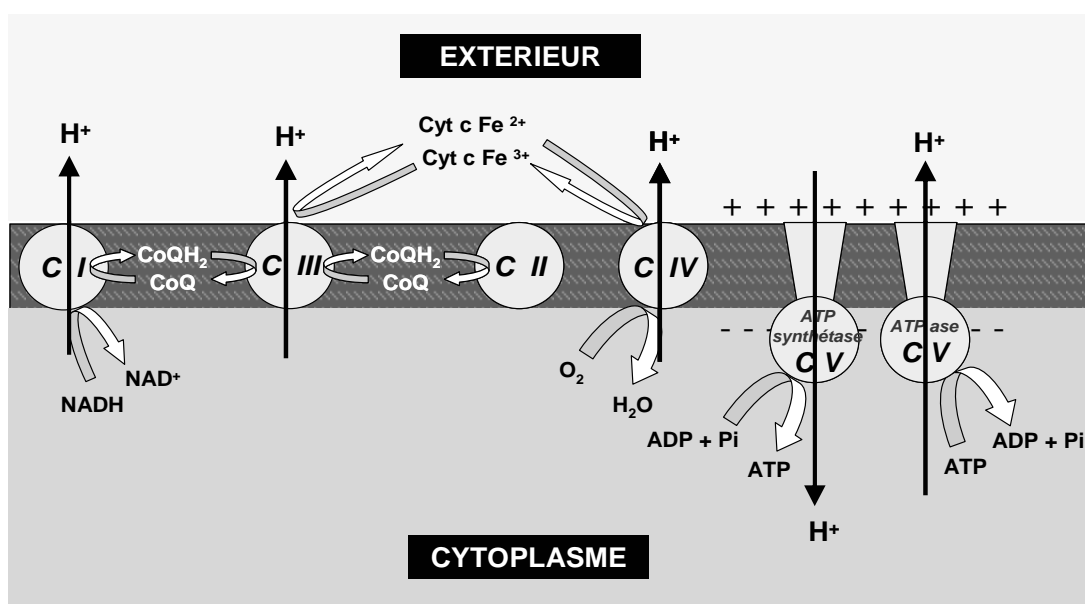


Figure 120 Schéma du principe de la chaîne respiratoire

### Effet de la réoxygénation

La réoxygénation du système a été immédiatement suivie par des changements significatifs sur les spectres (**Figure 120**).

Les marqueurs métaboliques retrouvent rapidement leur état initial. Après 6 heures, le pH intracellulaire retrouve sa valeur initiale de 7,7 (**Figure 119a**). Après réoxygénation, le taux d'ATP atteint instantanément sa valeur d'avant l'anoxie (**Figure 119b**). Quant aux polyphosphates, une augmentation immédiate a été observée (**Figure 119c**) probablement due à la reprise de la synthèse d'ATP qui requiert l'hydrolyse des longues chaînes polyphosphates en Pi.

### Effet de l'ajout de glucose

L'addition de glucose n'a eu aucun impact sur le pH intracellulaire (**Figure 119a**). Nous observons en revanche une augmentation du taux d'ATP qui est due à la métabolisation du glucose via la glycolyse (**Figure 119b**). Il n'y a pas d'augmentation significative de l'hydrolyse des chaînes polyphosphates (**Figure 119c**).

### Effet de l'ajout de phosphate

L'addition de phosphate n'a eu aucune influence sur le pH intracellulaire (**Figure 119a**), ni sur le taux d'ATP (**Figure 119b**). Une augmentation immédiate et attendue des polyphosphates (**Figure 119c**) a été observée à l'ajout de phosphate. Nous observons ensuite une diminution du signal car le phosphate a été intégré aux petites chaînes de polyphosphates qui se sont alors allongées jusqu'à devenir invisibles sur le spectre.

### II.1.2 Etude RMN *in vivo* du $^{13}\text{C}$ du métabolisme du carbone

La **Figure 121** présente les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  *in vivo* acquis après  $t = 0, 10, 15$  et  $118$  heures d'incubation avec du glucose marqué  $[1-^{13}\text{C}]$ . Les signaux résonant à  $\delta = 97,2$  ppm et  $\delta = 93,4$  ppm correspondent respectivement aux signaux du carbone 1 du glucose en positions  $\beta$  et  $\alpha$ . Les intensités de ces signaux décroissent avec le temps alors que deux nouveaux signaux résonant à  $\delta = 94,4$  ppm et  $\delta = 61,7$  ppm apparaissent et augmentent. Leurs déplacements chimiques laissent penser qu'il s'agirait du tréhalose.

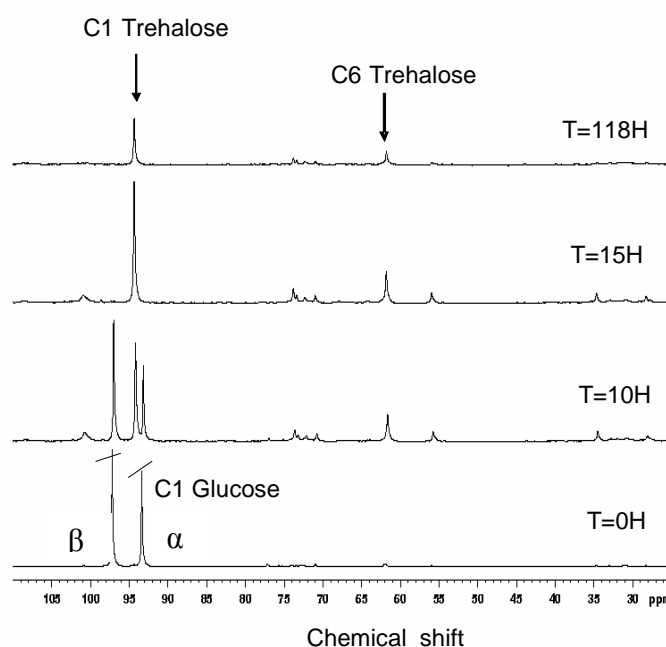
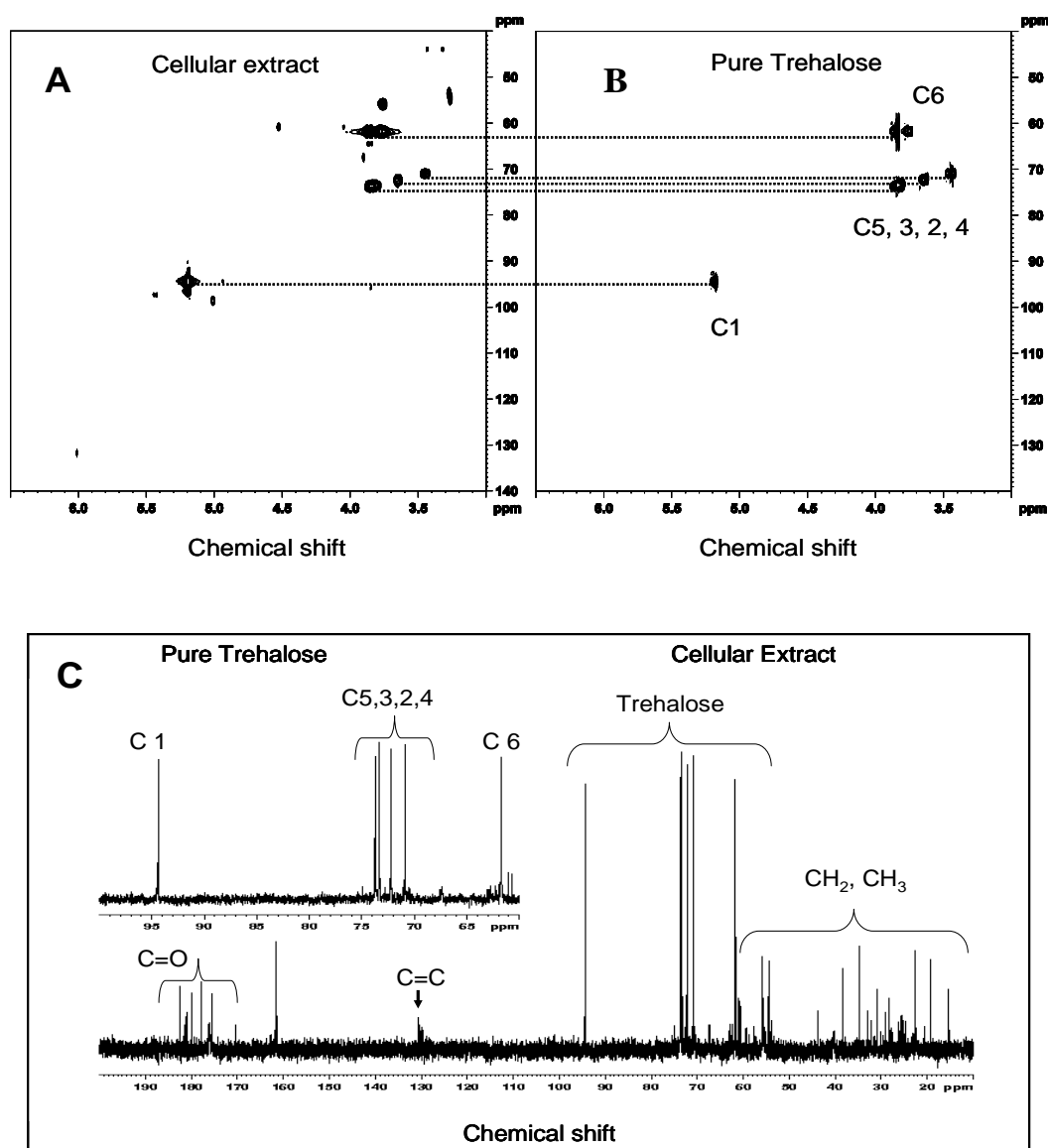


Figure 121 Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  *in vivo* de bactéries *R. rhodochrous* incubées avec du glucose  $[1-^{13}\text{C}]$

En comparant le spectre RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  des extraits cellulaires obtenus (**Figure 122 A**) après 118 heures d'incubation avec celui du tréhalose commercial (**Figure 122 B**), nous avons confirmé l'attribution des deux signaux résonant à  $\delta = 94,4$  ppm et  $\delta = 61,7$  ppm comme étant respectivement ceux du C1 et du C6 du tréhalose.



**Figure 122** Spectres de RMN 2D HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (A) des extraits cellulaires de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 obtenus après incubation avec du glucose marqué [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] pendant 118 h ; (B) du tréhalose commercial pur ; (C), spectre de RMN 1D  $^{13}\text{C}$  des extraits perchloriques de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 avant l'addition de glucose [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ], les signaux du tréhalose pur sont présentés en insert.

Il est à noter que d'autres signaux correspondant aux  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle des autres atomes de carbone du tréhalose (C2,  $\delta = 72,2$  ppm ; C3,  $\delta = 73,7$  ppm ; C4,  $\delta = 70,8$  ppm ; C5,  $\delta = 74,3$  ppm) sont visibles sur les spectres des **Figure 121** et **Figure 122 A**. La **Figure 122 C** présente un spectre des extraits perchloriques avant incubation en présence de glucose marqué  $[1-^{13}\text{C}]$ . Le spectre met en évidence, grâce aux signaux de  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle, la présence de tréhalose endogène dans les cellules ce qui indique clairement que la bactérie *R. rhodochrous* stocke ce composé.

La **Figure 123** présente l'évolution avec le temps des intégrales relatives du C1 $\alpha$  et du C1 $\beta$ -glucose, du C1 et du C6-tréhalose. Le glucose  $[1-^{13}\text{C}]$  est dégradé en 15 heures tandis que le tréhalose est synthétisé. Lorsque cette source de carbone n'est plus disponible, les signaux correspondant au C1 et au C6 du tréhalose restent constants montrant que le tréhalose n'est plus synthétisé. Après 30 heures, le tréhalose qui vient d'être synthétisé est alors réutilisé par les cellules comme le montre la diminution des signaux C1 et C6 du tréhalose.

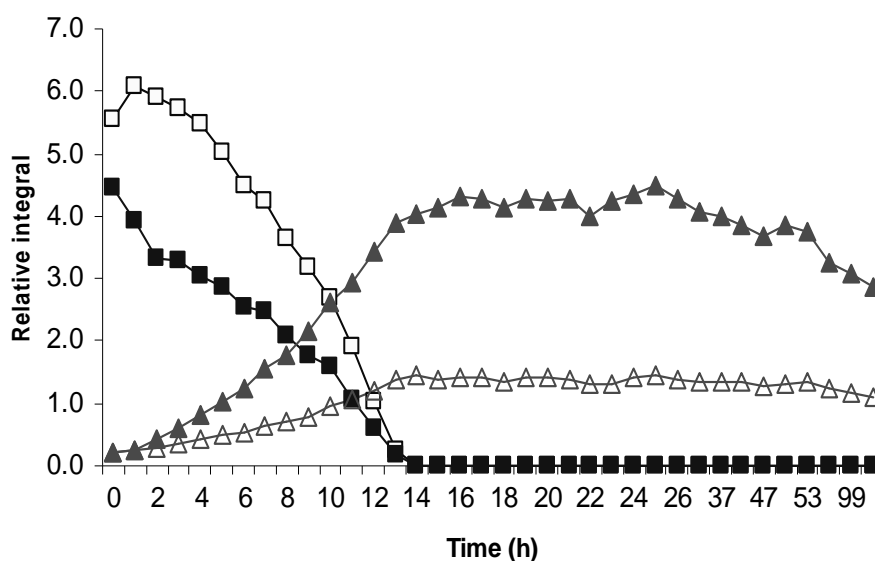


Figure 123 Evolution avec le temps des valeurs des intégrales du C1 $\alpha$  (■) et du C1 $\beta$  (□) du glucose, du C1 (▲) et du C6 du trehalose (△)

La détection du C1 du tréhalose est en accord avec la synthèse directe à partir du glucose  $[1-^{13}\text{C}]$  via le glucose-6-P  $[1-^{13}\text{C}]$ . La présence inattendue de tréhalose marqué en C6 résulte de la remontée de la partie supérieure de la voie d'Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) incluant le triangle aldolase/triose-phosphate isomérase. La fructose-1,6-biphosphate aldolase catalyse le clivage du fructose 1,6-



diphosphate en dihydroxyacétone-phosphate et en phosphoglyceraldéhyde qui sont facilement isomérisés par la triose-phosphate isomérase. La **Figure 124** montre la synthèse directe du tréhalose ainsi que sa synthèse par réversion. Nous n'avons fait apparaître qu'un seul isotopomère du tréhalose mais il en existe 16 du fait des différentes recombinaisons possibles entre la dihydroxyacétone-phosphate et le phosphoglyceraldéhyde.

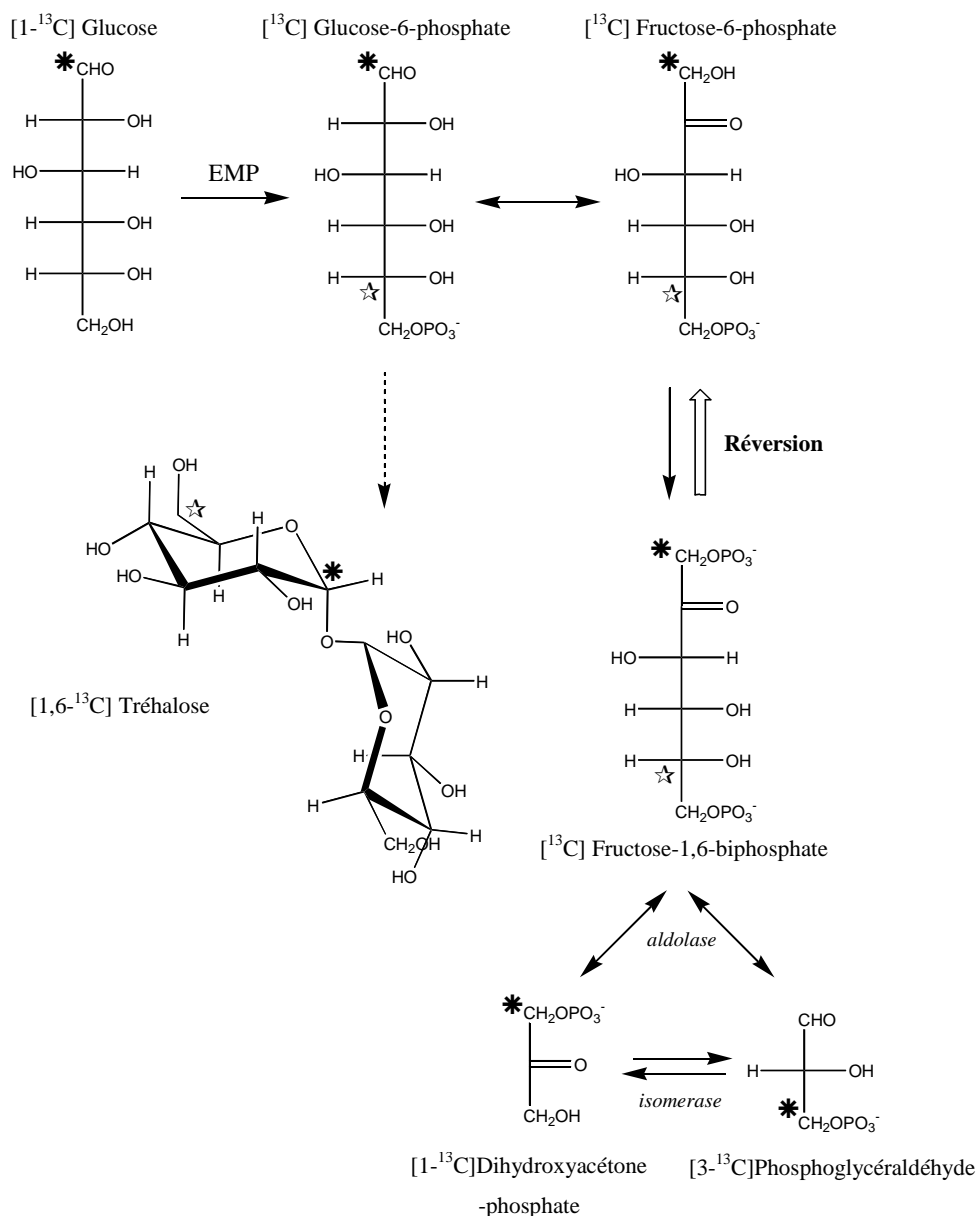


Figure 124 Voies de synthèse du tréhalose lorsque *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 est incubée en présence de glucose marqué  $[1-^{13}\text{C}]$  ( $*$ ) par synthèse directe ( $\star$ ) après réversion

Les bactéries appartenant au genre *Rhodococcus* sont connues pour produire des biosurfactants qui sont des glycolipides contenant du tréhalose comme glucides (Lang et Philp, 1998). Une analyse attentive du spectre du  $^{13}\text{C}$  de la **Figure 122C** montre la présence de signaux pouvant correspondre aux déplacements chimiques de chaînes lipidiques sur le tréhalose, chaînes contenant les groupes fonctionnels suivants,  $\text{C}=\text{O}$  ou  $\text{COOH}$  ( $\delta = 181\text{-}174$  ppm),  $\text{CH}=\text{CH}$  ( $\delta = 128\text{-}129$  ppm),  $\text{CH}_2$  ou  $\text{CH}_3$  ( $\delta = 14\text{-}54$  ppm) (Philip et al., 2002). Il est à noter que ces signaux, comme ceux du tréhalose, sont présents uniquement dans les échantillons du milieu de culture brut (avec les bactéries) et pas dans les surnageants des mêmes échantillons après centrifugation. Pour confirmer la présence de ces surfactants chez *R. rhodochrous* OBT18, des expériences complémentaires ont été réalisées en suivant la méthode d'Iyer et al. (2006). Le milieu d'incubation brut (avec bactéries) et après centrifugation (sans bactérie) a été mélangé à différents solvants organiques, l'hexane, le pentane, le xylène, l'hexadécane et la paraffine. La visualisation de la zone d'émulsification à l'interface eau/solvant organique donne une indication sur la production de biosurfactants par la bactérie. La propriété émulsifiante a été clairement visualisée avec la culture entière (**Figure 125b**) mais pas avec le milieu de culture centrifugé qui ne contenait pas de bactéries (**Figure 125a**). Ce résultat signifie que les surfactants produits sont intimement liés à la surface de la bactérie et qu'ils ne sont pas relargués dans le milieu. Ceci est en accord avec les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  qui ont mis en évidence la présence de ces glycolipides dans les extraits cellulaires seulement. Selon Lang et Philip (1998), la majorité des glycolipides produits par les *Rhodococci* sont localisés à la surface de la cellule et ne sont pas excrétés dans le milieu de culture.

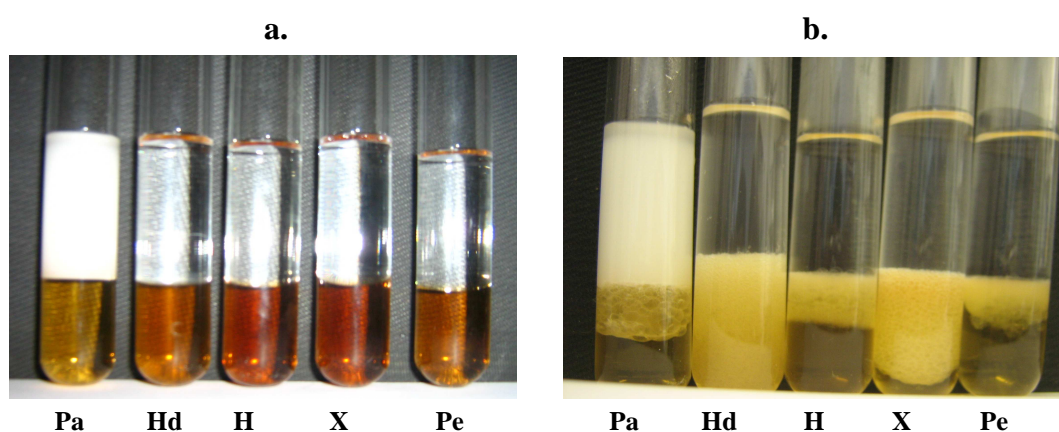


Figure 125 Photographies prises après les tests d'émulsion (a) avec les milieux de culture, (b) avec les bactéries. P : Pa : paraffine ; Hd : hexadécane ; h : hexane ; X : xylène ; Pe : pentane

## II.2 Comportement métabolique de *R. rhodochrous* lors des procédés de biodégradation de l'ABT en présence ou non de FeNTA

Nous avons montré que *R. rhodochrous* OBT18 biotransforme l'ABT en 6OH-ABT et que cette dégradation est fortement accélérée par la présence du complexe FeNTA, en présence ou non de lumière (Bunescu et al., 2008a). Le FeNTA est lui dégradé en IDA, glycine et formiate à la fois par la lumière et par *R. rhodochrous*, le procédé de photodégradation du FeNTA conduisant à la production de radicaux (Bunescu et al., 2008b). Tous ces composés peuvent être toxiques pour les cellules. Nous avons donc étudié le métabolisme de *R. rhodochrous* au cours de ces différents procédés de dégradation de l'ABT. Dans cette partie, nous avons travaillé avec les bactéries encapsulées dans les billes d'alginate.

### II.2.1 Expériences de biodégradation en présence ou non de FeNTA et en absence de lumière

Quatre expériences ont été réalisées pour déterminer les effets de la biodégradation d'ABT sur le métabolisme de *R. rhodochrous* OBT18. Nous avons incubé les cellules de *Rhodococcus rhodochrous* avec:

- ABT (0,5 mM)
- FeNTA (1 mM)
- ABT (0,5 mM) et FeNTA (1mM)
- Eau minérale Volvic® (expérience témoin)

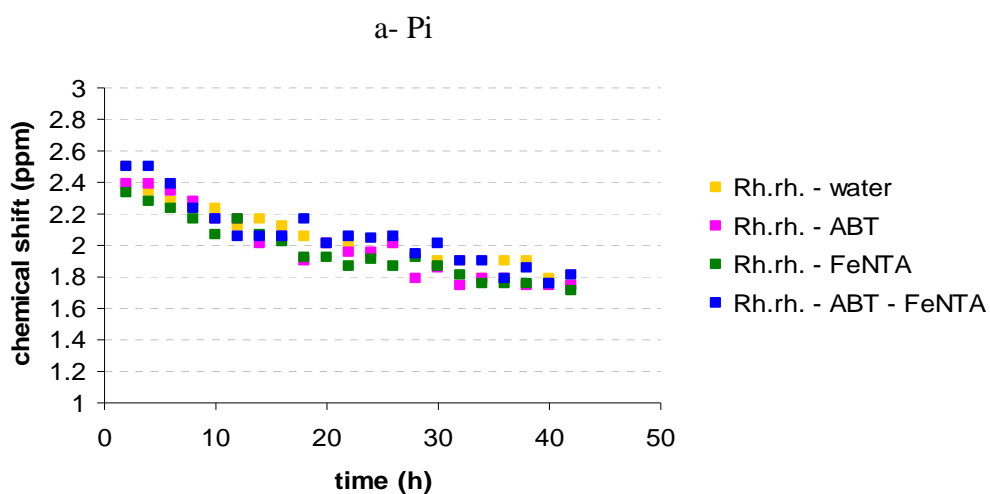
Le métabolisme énergétique a été suivi par RMN  $^{31}\text{P}$  *in vivo*, en absence de lumière (conditions 2).

La **Figure 126a** présente l'évolution du déplacement chimique du Pi lors de ces quatre expériences. L'observation la plus importante concerne l'évolution similaire du déplacement chimique du Pi montrant que ni l'ABT, ni le FeNTA, ni l'ABT + le FeNTA n'ont d'influence sur le pH intracellulaire. Une diminution du déplacement chimique de 2,4 ppm à 1,8 ppm en 40 heures correspondant à une diminution de la valeur du pH de 7,7 à 7,1 est cependant observée. Cette diminution de pH est cependant lente si nous la comparons avec celle observée lors de l'anoxie qui était de 7,7 à 6,7 en 10 heures (voir **Figure 119a**).

La **Figure 126b** présente l'évolution du taux d'ATP à partir de l'intégration des signaux du  $\beta$ -ATP. Nous remarquons là aussi une évolution similaire dans les quatre cas, indiquant que ni l'ABT, ni le FeNTA, ni le mélange des deux n'ont d'impact sur ce marqueur énergétique. Si nous décrivons ces courbes d'évolution, nous observons une augmentation lors des 15 premières heures suivie d'une stabilisation.

La **Figure 126c** présente l'évolution du taux de polyphosphates. Là encore, des courbes d'évolution similaires sont observées soulignant l'absence d'impact de l'ABT, du FeNTA ou du mélange des deux sur les cellules. Rappelons que l'augmentation du taux de polyphosphates ne correspond pas à l'augmentation du taux global de polyphosphates mais plutôt à l'augmentation du nombre de courtes chaînes (phénomène dû au temps de relaxation T2 expliqué précédemment). Au début des expériences, les polyphosphates sont majoritairement à chaînes longues, invisibles en RMN. Avec le temps, les cellules ont besoin de Pi pour maintenir leur activité métabolique. Comme il n'y a pas d'apport de phosphate par le milieu, les polyphosphates à longues chaînes sont hydrolysés donnant naissance à des polyphosphates à chaînes plus courtes et donc visibles par RMN.

La **Figure 126d** présente l'évolution de la concentration en ABT avec le temps au cours de l'expérience ABT + FeNTA. Le suivi a été fait par HPLC et montre que l'ABT est dégradé à hauteur de 0,12 mM en 45 heures. Cette expérience nous a servi de témoin pour contrôler l'activité de dégradation des cellules.



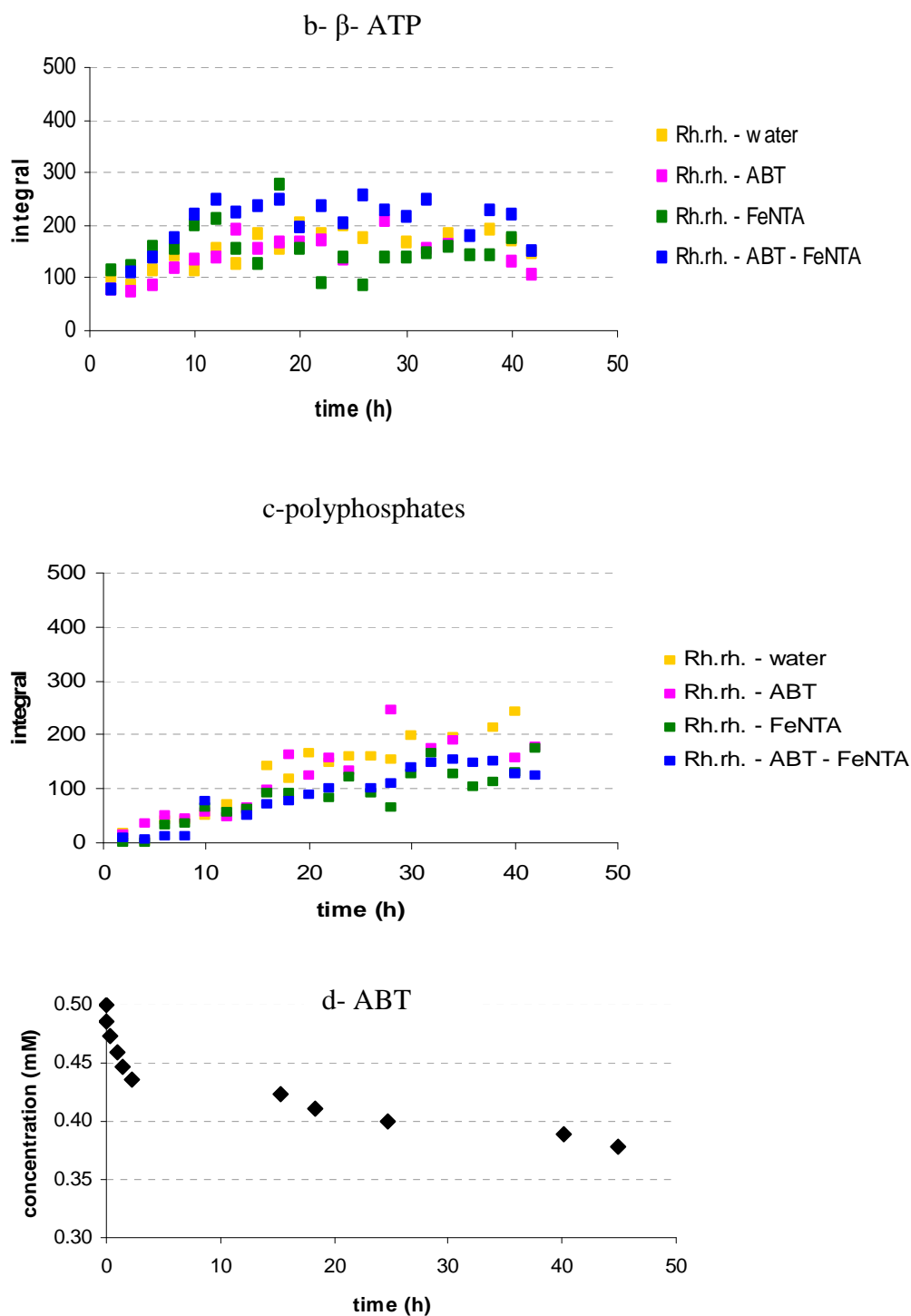


Figure 126 Comportement métabolique de *R. rhodochrous* OBT18 dans différentes conditions de biodégradation, en absence de lumière – valeurs provenant des spectres de RMN in vivo - (a) évolution du déplacement chimique du  $P_i$  ; (b) évolution du taux de  $\beta$ -ATP ; (c) évolution du taux de polyphosphates ; (d) évolution de la concentration en ABT

## II.2.2 Expériences de biodégradation en présence de FeNTA et de lumière

Un système spécial permettant de travailler en présence de lumière a été conçu par nos collaborateurs du CEA de Grenoble et a été utilisé pour réaliser les expériences en présence de lumière (voir conditions 1 partie Matériel et Méthodes). Ce système nous a permis d'étudier l'influence de la lumière sur le métabolisme de *R. rhodochrous*.

La **Figure 127** présente les résultats obtenus lors de la biodégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium, en présence du complexe FeNTA, et en présence ou non de lumière.

La **Figure 127a** présente l'évolution du déplacement chimique du Pi au cours du temps : les évolutions sont similaires en présence ou non de lumière et montrent une légère acidification avec le temps. La **Figure 127 b** met en avant une évolution similaire du taux d'ATP dans les deux cas. La **Figure 127 c** montre également qu'il n'y a pas de différence entre les deux expériences au niveau de l'évolution du taux de polyphosphates.

Ceci nous permet de conclure quant à l'absence d'impact de la lumière sur le métabolisme de *R. rhodochrous* ainsi qu'à l'absence d'effets toxiques causés par la présence des photoproduits issus de la dégradation de l'ABT et du FeNTA, en particulier des radicaux.

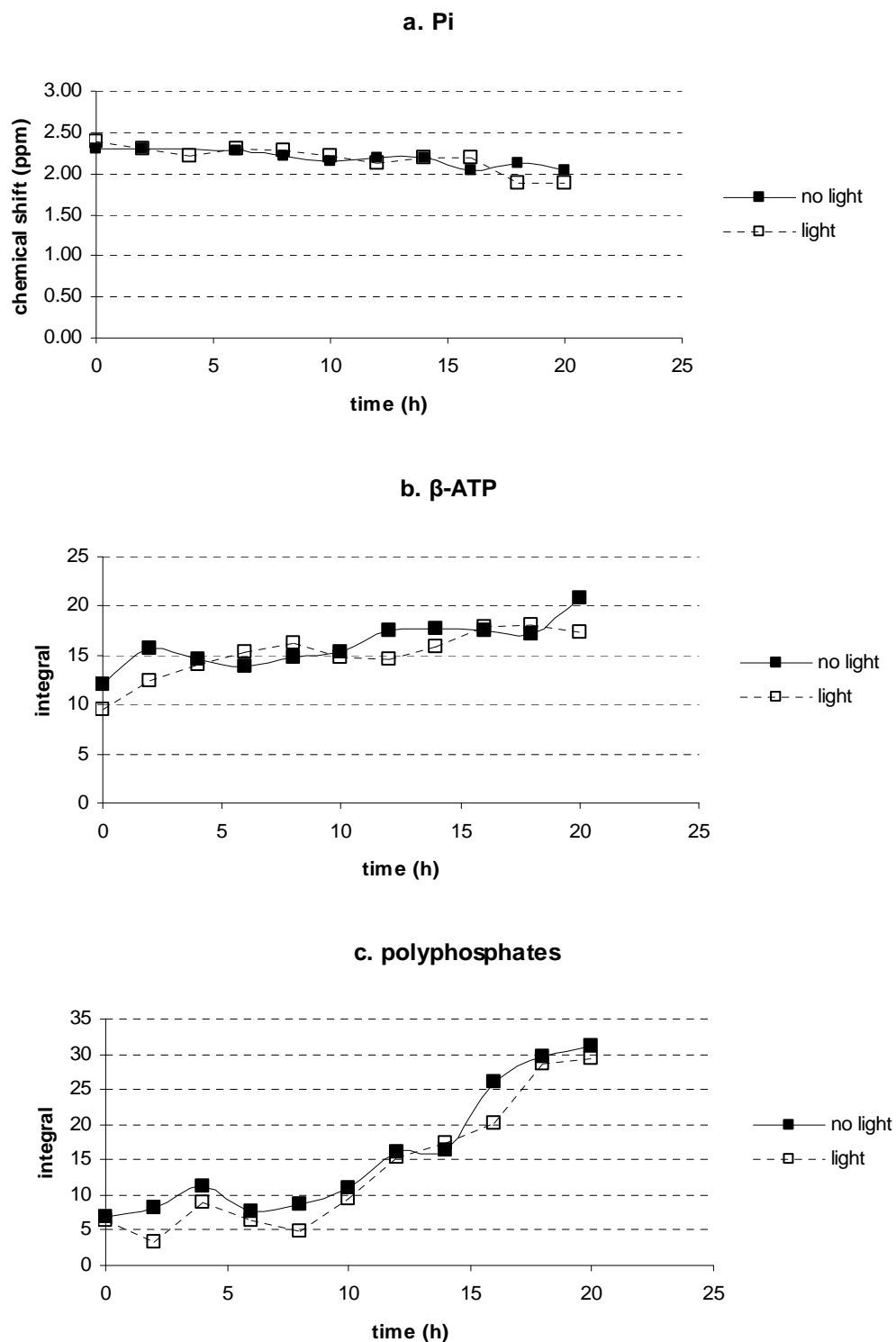


Figure 127 Comportement métabolique de *R. rhodochrous* OBT18 lors des procédés de photobiodégradation en présence ou non de lumière – conditions : ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM) - valeurs provenant des spectres de RMN in vivo. (a) évolution du déplacement chimique du Pi ; (b) évolution du taux de  $\beta$ -ATP ; (c) évolution du taux de polyphosphates

## II.3 Conclusions

Le métabolisme des cellules isolées de l'environnement est peu décrit dans la littérature. Dans cette seconde partie de mon travail, nous avons utilisé la RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{31}\text{P}$  *in vivo* pour obtenir des informations sur le métabolisme du carbone et sur le métabolisme énergétique de la souche *R. rhodochrous* OBT18.

Nous avons montré, dans un premier temps, que cette bactérie possède des composés de réserve : le tréhalose et les polyphosphates. La présence de tels composés détectés par RMN *in vivo* dans des souches microbiennes a déjà été décrite dans la littérature (Grivet et Delort, 2008) mais c'est la première fois qu'elle l'est pour des souches de *Rhodococcus*. Il est probable que ces composés endogènes permettent à la bactérie de survivre en l'absence d'apport de carbone ou de phosphate exogènes. Par exemple, nous avons remarqué que les bactéries encapsulées dans les billes d'alginate de calcium pouvaient être stockées plusieurs mois à 4°C dans une solution de NaCl (8‰) sans perdre leur activité métabolique et leurs propriétés de dégradation. Il est par ailleurs évident, d'après les spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  *in vivo*, que les pools d'ATP ainsi que le pH cytoplasmique de la cellule sont maintenus constants durant plusieurs heures d'incubation dans l'eau, c'est-à-dire sans source de carbone ni de phosphore, et que ces valeurs sont proches de celles obtenues lorsque du glucose est ajouté (**Figure 118** et **Figure 119**). Les polyphosphates sont dégradés en Pi lorsque les cellules ont besoin de produire de l'ATP ou des métabolites phosphorylés. Ils sont synthétisés lorsque du Pi est ajouté. Les polyphosphates sont impliqués dans le bilan phosphorylé et maintiennent l'équilibre en phosphore de la cellule.

La RMN du  $^{13}\text{C}$  *in vivo* est très utile pour l'étude du cycle des glucides chez les cellules microbiennes (Portais et Delort, 2002). La réversion de la voie EMP ainsi que la présence d'un cycle grâce au triangle aldolase/triose-phosphate isomérase ont été montrées grâce à la présence de tréhalose marqué sur plusieurs positions chez *Saccharomyces cerevisiae* (Campbell-Burk et al., 1987, Tran-Dinh et al., 1991), *Pichia pastoris* (Barton et al., 1982) et *Propionibacterium* (Deborde et al., 1996). Nous avons montré ici que le même phénomène apparaissait chez *R. rhodochrous* OBT18. Le tréhalose marqué en C1/C6 représente 25% du tréhalose nouvellement synthétisé ce qui signifie que 50% du glucose constituant le tréhalose est passé par le triangle aldolase/triose-phosphate isomérase.



Les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  ont également révélé chez *R. rhodochrous* OBT18 la présence potentielle de biosurfactants tels que des glycolipides contenant le tréhalose comme glucide. Des expériences complémentaires ont confirmé la présence de ces biosurfactants au niveau de la surface de la bactérie. Ceci rend la surface de la cellule hydrophobe et de cette manière facilite la solubilisation des composés hydrophobes. Ce mécanisme a été montré chez plusieurs *Rhodococci* (Lang et Philp, 1998), particulièrement chez les souches alcanotrophes. Dans le cas de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18, la présence de ces biosurfactants peut faciliter la dégradation des benzothiazoles qui sont généralement des composés peu solubles.

Les expériences de RMN *in vivo* du  $^{31}\text{P}$  présentées dans ce travail ont permis de suivre la réponse de *R. rhodochrous* OBT18 à différents stress environnementaux ; pour cela, nous avons considéré l'évolution des marqueurs du métabolisme énergétique comme le pH intracellulaire, le taux d'ATP et de polyphosphates. Lorsque les cellules sont mises en présence d'ABT, de FeNTA ou des deux à la fois, ainsi qu'en présence des métabolites et des photoproduits issus de ces conditions d'incubation, ces marqueurs métaboliques ne sont pas perturbés par rapport au témoin. Il est également intéressant de noter que la présence de la lumière ainsi que celle de radicaux ( $\text{OH}^{\bullet}$  et  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) provenant de la photodégradation ne présente pas d'effet toxique, ni n'a d'influence sur les cellules. Les valeurs du pH et du taux d'ATP chutent brutalement uniquement lorsque les cellules sont privées d' $\text{O}_2$  et que la chaîne respiratoire est altérée chez cette bactérie aérobic stricte. Un résultat surprenant est mis en évidence : la capacité de *R. rhodochrous* OBT18 à retrouver rapidement un gradient de pH et un taux d'ATP normaux lorsque le système est réoxygéné, même après une longue période d'anoxie.

En conclusion, cette étude RMN du métabolisme de *R. rhodochrous* OBT18 a montré que cette bactérie est très bien adaptée aux conditions environnementales où le changement permanent des conditions induit différents stress. Tout d'abord, la bactérie contient des sources de carbone et de phosphore endogènes qui lui permettent de tenir des heures dans un milieu où il n'y en a pas. Par ailleurs, cette bactérie ne semble pas sensible à la présence de radicaux, de lumière et de certains xénobiotiques et maintient facilement son métabolisme énergétique constant. De plus, cette souche produit des biosurfactants qui l'aide à dégrader des composés hydrophobes. Enfin, bien qu'il s'agisse d'une bactérie aérobic stricte, elle peut survivre à une période d'anoxie de plusieurs heures et retrouve très vite un métabolisme énergétique normal.

### III RÔLE DU FER DANS LES PROCESSUS DE PHOTO- ET DE BIODEGRADATION DE L'ABT

Bunescu et al. (2008a) ont montré récemment que l'ajout de FeNTA augmentait considérablement les capacités dégradatives de *R. rhodochrous* sur l'ABT. Ils ont constaté que le ligand NTA seul ne rentrait pas dans la cellule puisqu'il n'était pas dégradé mais qu'en revanche, lorsque les cellules sont en présence du complexe FeNTA, le NTA est dégradé prouvant que le complexe FeNTA est internalisé par la cellule (Bunescu et al., 2008b). La **Figure 128** montre l'entrée du complexe dans la cellule, le NTA est alors dégradé en IDA, glycine et formiate. Le Fe(III) libéré est réduit en Fe(II) qui viendrait alors activer certaines enzymes intervenant dans la biodégradation de l'ABT.

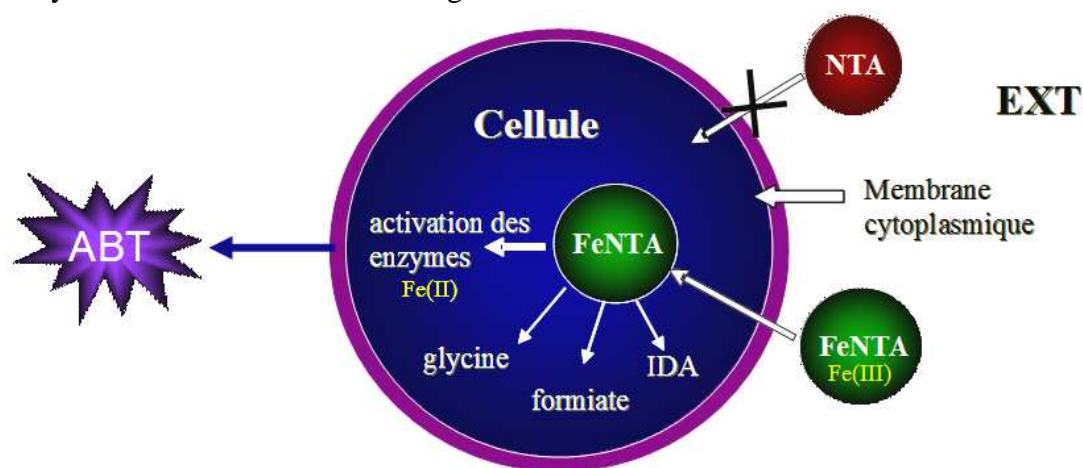


Figure 128 Internalisation du complexe FeNTA par *R. rhodochrous* (adapté de Bunescu, 2006)

Dans cette partie, nous avons voulu savoir sous quelle(s) forme(s) le fer pouvait accélérer la dégradation de l'ABT et être internalisé par la cellule. Pour cela, nous avons testé différents composés contenant du fer qui peuvent être classés en deux catégories : d'une part, les complexes organiques de fer et d'autre part, les oxydes et les oxy(hydr)oxydes de fer dont les formes sont fréquentes dans la nature.

#### III.1 Les complexes organiques de fer étudiés

Nous avons testé les complexes FeNTA (complexe déjà utilisé dans les études précédentes), FeEDDS et Fe-citrate. Nous travaillons avec des concentrations en complexe de fer de 1 mM, la concentration en ABT est de 0,5 mM.

### III.1.1 Le complexe FeNTA

Nous rappelons dans la **Figure 129**, la structure du complexe FeNTA. Le NTA peut séquestrer les ions métalliques pour former des complexes hydrosolubles. Cet agent chélatant important est utilisé, dans certains pays, comme adjuvant dans les détergents pour remplacer les phosphates dont l'utilisation est limitée à cause de leur contribution à l'eutrophisation des lacs et des étangs. Il est également utilisé dans le traitement de l'eau des chaudières pour prévenir l'entartrage. Il sert aussi, mais dans une moindre mesure, dans les domaines de la photographie, de la fabrication des textiles, de la production du papier et de cellulose, dans les opérations de placage des métaux et de nettoyage.

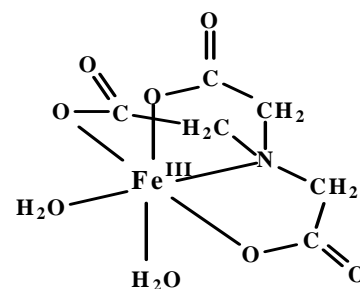


Figure 129 Structure du complexe FeNTA

La **Figure 130** montre l'évolution de la concentration en ABT au cours de sa biodégradation par *R. rhodochrous* en présence et en absence de FeNTA.

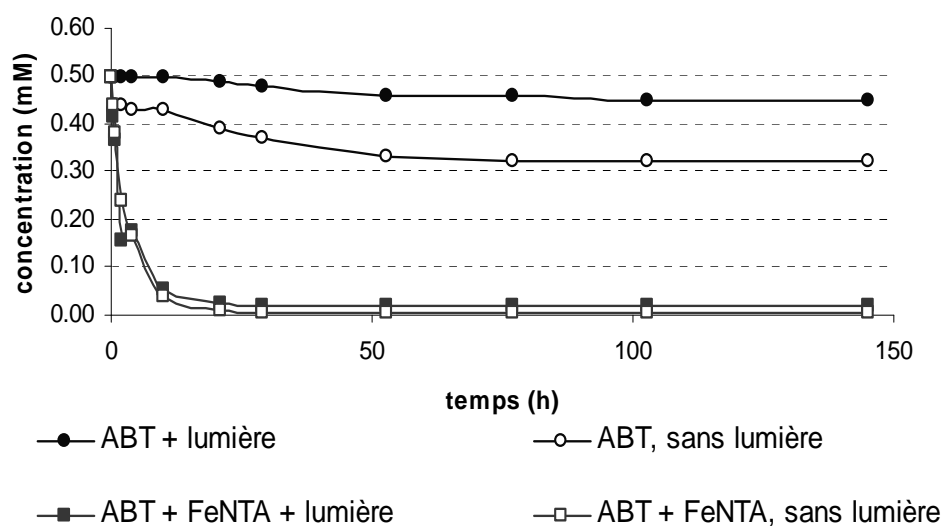
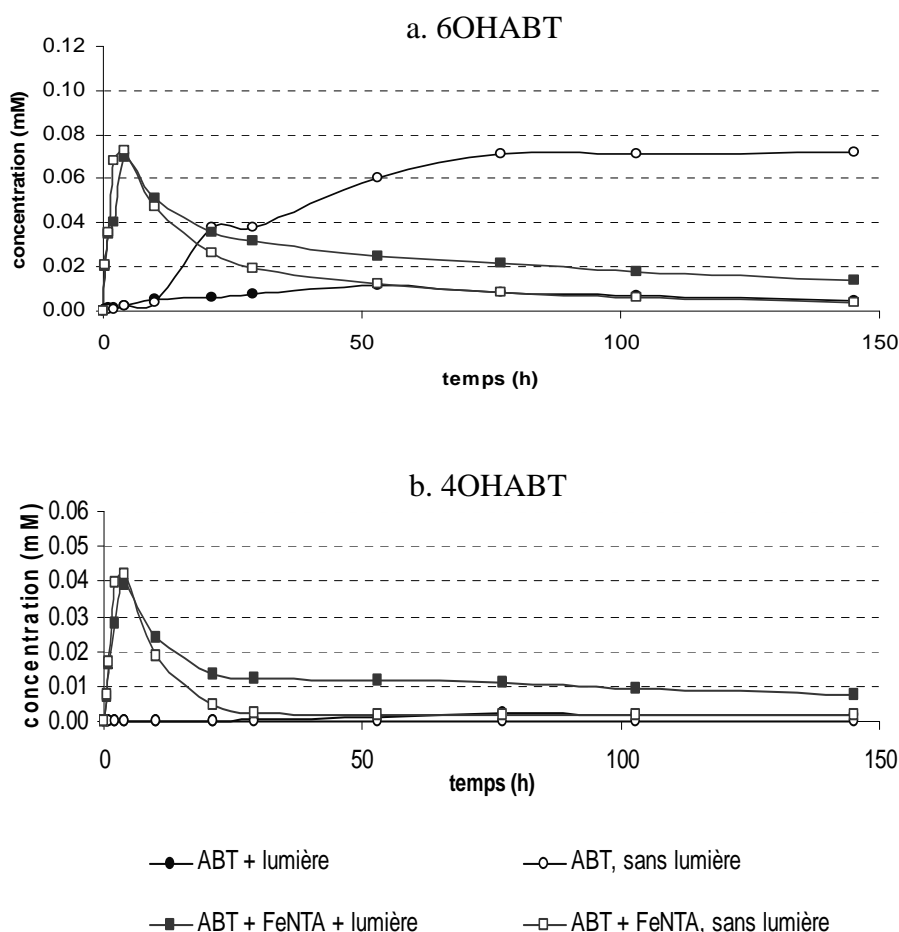


Figure 130 Dégradation de l'ABT (0,5 mM) par *R. rhodochrous* en présence du complexe FeNTA (1 mM)

Comme nous l'avons vu précédemment, en présence de FeNTA la biodégradation de l'ABT est très fortement accélérée : en 30 heures, la disparition de l'ABT est totale en absence de lumière et atteint 96 % en présence de lumière contre respectivement 26 % et 4 % pour la biodégradation de l'ABT seul.



*Figure 131 Evolutions de la concentration en 6OHABT (a) et en 4OHABT (b) dans les expériences de biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence ou non de FeNTA (1 mM)*

La **Figure 131a** montre que le 6OHABT est produit en présence de FeNTA avec et sans lumière. Après 4 heures d'incubation, sa concentration maximale est atteinte (0,075 mM) avec ou sans lumière. Ensuite, le 6OHABT est dégradé à son tour, et de manière plus rapide en l'absence de lumière. L'évolution du 4OHABT (**Figure 131b**) est très similaire: après 4 heures d'incubation, la concentration en 4OHABT atteint un maximum (0,040 mM) avec ou sans lumière. Le 4OHABT est lui aussi dégradé toujours plus rapidement en absence d'irradiation.

Si nous nous intéressons au témoin, dans le cas sans lumière, le 6OHABT s'accumule dans le milieu (0,075 mM). Le 4OHABT n'est pas détecté. En présence de lumière, la concentration en 6OHABT reste très faible et ne dépasse jamais 0,02 mM. Une faible dégradation est observée après 55 heures d'incubation, le 6OHABT ne s'accumule donc pas dans ce cas. Le 4OHABT est détecté par HPLC mais reste en très faible quantité. Nous concluons que sans lumière, ni fer, le 6OHABT s'accumule alors qu'en présence de lumière et/ou de fer, il est dégradé. De même lorsqu'il n'y a ni lumière, ni fer, il n'y a pas de 4OHABT formé, alors qu'en présence de lumière et/ou de fer, il est produit.

Parallèlement à la dégradation de l'ABT, l'évolution de la concentration en fer a été également suivie. (**Figure 132**).

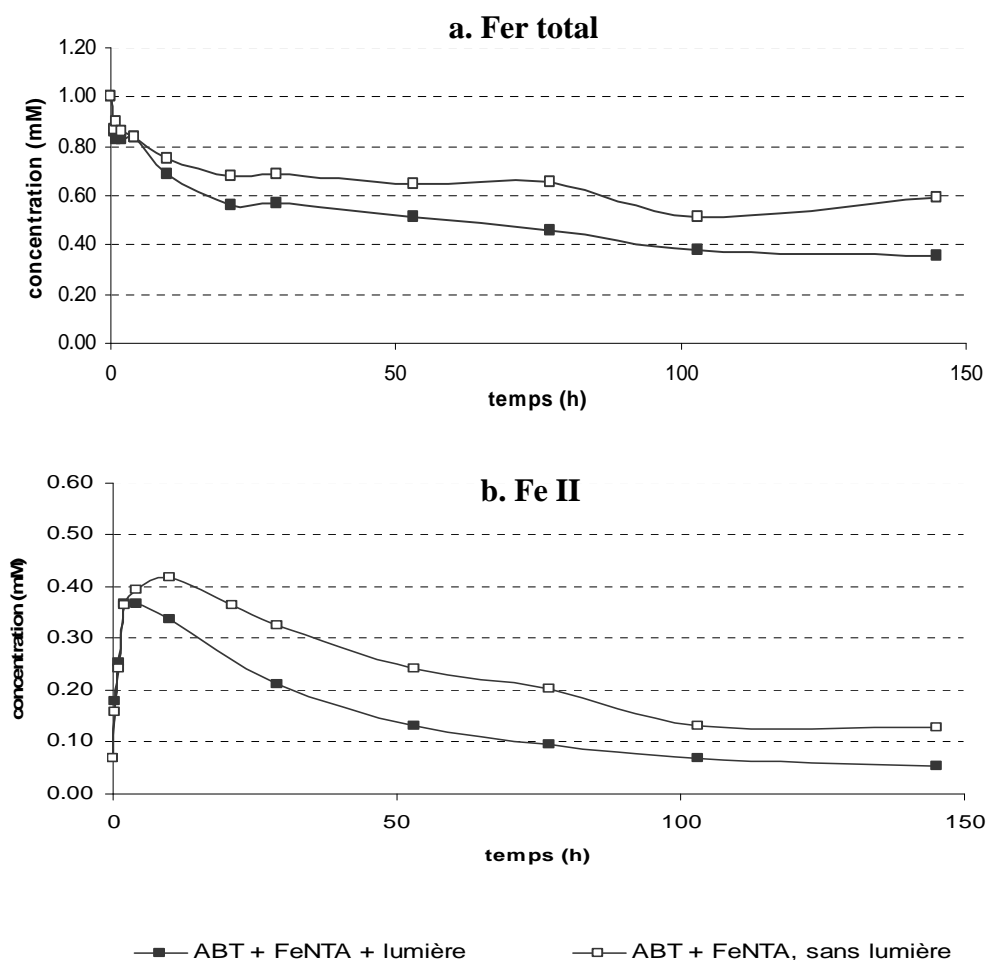


Figure 132 *Evolutions de la concentration en fer total et en Fe(II) lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM)*

La **Figure 132a** montre qu'en présence ou en absence de lumière, les courbes des concentrations en fer total évoluent de la même manière ; les valeurs sont cependant plus faibles sous irradiation. D'après le **Tableau 16**, nous observons qu'après 10 heures d'expériences la disparition du fer est essentiellement due à la réoxydation lente du complexe de Fe(II) en Fe(III) qui précipite ensuite. Cette observation vient du fait que les variations du fer total et du Fe(II) sont très proches entre  $t = 10$  h et un  $t$  donné. La réduction du Fe(III) en Fe(II) est importante au début de l'expérience puis n'est plus observée par la suite.

La disparition de fer total est plus importante en présence de lumière, résultat qui prouve qu'il y a dans ce cas deux phénomènes qui permettent de réduire le Fe(III) en Fe(II) : la photooxydoréduction du complexe et une oxydoréduction d'origine microbiologique.

		concentration (mM)			
		fer total	Fe(II)	$\Delta$ fer total (entre t et t=10h)	$\Delta$ Fe(II) (entre t et t=10h)
avec lumière	10 h	0.69	0.34		
	30 h	0.57	0.21	<b>0.12</b>	<b>0.13</b>
	50 h	0.51	0.13	<b>0.18</b>	<b>0.21</b>
	75 h	0.46	0.10	<b>0.23</b>	<b>0.24</b>
	100 h	0.38	0.07	<b>0.31</b>	<b>0.27</b>
	145 h	0.35	0.05	<b>0.34</b>	<b>0.29</b>
		concentration (mM)			
		fer total	Fe(II)	$\Delta$ fer total (entre t et t=4h)	$\Delta$ Fe(II) (entre t et t=4h)
sans lumière	4 h	0.84	0.39		
	30 h	0.69	0.32	<b>0.15</b>	<b>0.07</b>
	50 h	0.65	0.24	<b>0.19</b>	<b>0.15</b>
	75 h	0.65	0.20	<b>0.19</b>	<b>0.19</b>
	100 h	0.51	0.13	<b>0.33</b>	<b>0.26</b>
	145 h	0.59	0.13	<b>0.25</b>	<b>0.26</b>

Tableau 16 *Biodégradations de l'ABT (0,5 mM) par Rhodococcus rhodochrous en présence de FeNTA (1 mM) : variations de la concentration en fer total et en Fe(II) au cours du temps*

La **Figure 132b** montre que la concentration en Fe(II) augmente rapidement dès le début de l'expérience, en présence ou non de lumière. Ce phénomène s'explique facilement en présence de lumière *via* le processus photoredox qui conduit à la formation de Fe(II). Par contre, en absence de lumière, l'augmentation rapide du Fe(II) montre la capacité des cellules à réduire le Fe(III) en Fe(II) et donc à utiliser le complexe. Cette présence de Fe(II) à des pH compris entre 7,0 et 8,5 est due à la présence d'un ou plusieurs composé(s) organique(s) qui stabilise(nt) le Fe(II) par complexation. En effet, sans la présence d'une molécule stabilisant le Fe(II), sa réoxydation en Fe(III) à ces pH est quasi immédiate. Nous notons également qu'il y a moins de Fe(II) en présence de lumière ce qui laisse penser que le complexant du Fe(II) ou le complexe lui-même se dégrade photochimiquement. Pour connaître l'origine de cet agent stabilisant (bactérienne ou bien issu des produits de dégradation du FeNTA), nous avons étudié l'évolution de la concentration en Fe(II) lors de la dégradation de l'ABT en présence de FeNTA sans bactérie et lors de sa dégradation en présence à la fois de bactéries et de FeNTA. La **Figure 133** illustre les résultats obtenus :

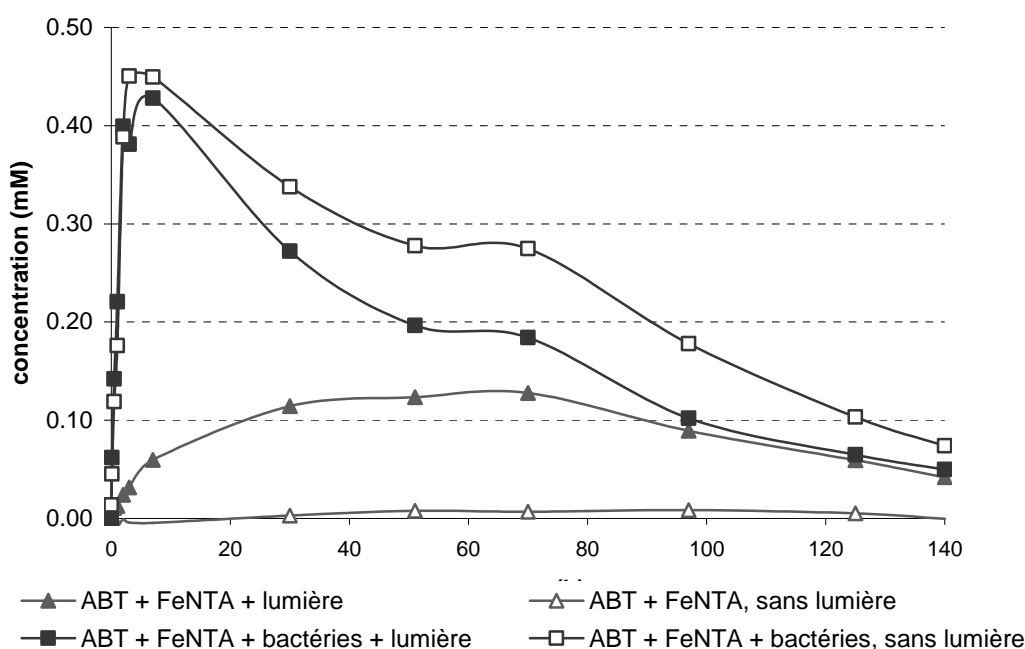


Figure 133 Concentrations en Fe(II) lors de la dégradation d'ABT (0,5 mM) avec ou sans lumière, en présence de FeNTA seul (1 mM) et en présence de FeNTA (1mM) et de bactéries

Nous pouvons faire deux remarques d'après la **Figure 133** :

- Tout d'abord, pour les expériences de dégradation de l'ABT en présence du complexe FeNTA (sans bactéries), le Fe(II) est présent dans le milieu. Même s'il s'agit de quantités faibles (environ 0,10 mM en absence de lumière ; maximum à 0,20 mM puis disparition complète en présence de lumière), ce Fe(II) ne peut être présent que parce qu'il est stabilisé par une molécule du milieu. En absence de bactérie, il ne peut donc s'agir que d'un photoproduit du NTA : l'IDA, la glycine ou le formiate. L'IDA est le photoproduit primaire majoritaire issu de la dégradation du FeNTA. Il a été montré qu'avec le Fe(II), il forme un complexe dont la constante  $\log K = 5,54$  (Abida, 2005). La **Figure 134** montre qu'en présence d'IDA, le Fe(II) est stabilisé plusieurs heures ; par contre, en absence d'IDA, le Fe(II) est immédiatement réoxydé en Fe(III).

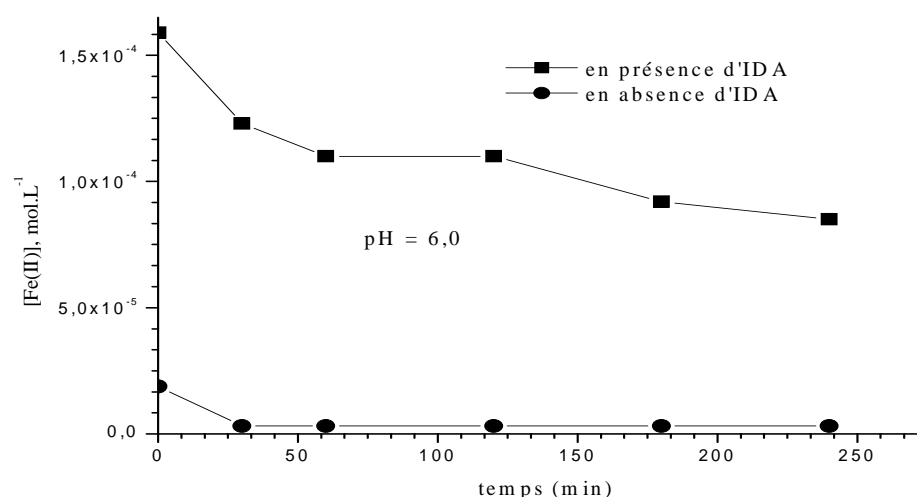


Figure 134 Evolution de la concentration en fer(II) en présence et en absence d'IDA, sous irradiation. [IDA] = 0,3 mM; [fer(II)] = 0,3 mM ; pH = 6,0 ; T = 25 °C (Abida, 2005)

- Ensuite, nous notons que les quantités de Fe(II) sont beaucoup plus importantes lorsque les bactéries sont présentes par rapport à la photodégradation seule. Le **Tableau 17** compare les concentrations maximales en IDA et en Fe(II) lors des processus de photodégradation du FeNTA seul et de biodégradation sans lumière. Nous avons mesuré un maximum de 0,2 mM de Fe(II) pour la photodégradation et de 0,45 mM pour la biodégradation. Parallèlement nous avons une concentration maximale en IDA de 0,55 mM et de 0,35 mM pour la photodégradation et la biodégradation respectivement. Ces résultats montrent que l'IDA produit par les microorganismes ne suffit pas à complexer tout le Fe(II) détecté et suggère la production d'un complexant par la bactérie.



	Conc. max. en IDA (mM)	Conc. max. en Fe(II) (mM)
<b>Photodégradation seule</b>	0,55	0,20
<b>Biodégradation seule</b>	0,35	0,45

Tableau 17 Concentrations en IDA et en Fe(II) lors des processus de photodégradation et de biodégradation du FeNTA (1 mM)

Finalement, au moins deux composés permettant de stabiliser le Fe(II) sont présents dans le milieu : l'un provenant de la dégradation du FeNTA (IDA), et l'autre d'origine bactérienne.

Nous avons par ailleurs fait un suivi en RMN  $^1\text{H}$  de la dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* en présence de FeNTA et en absence de lumière pour quantifier les différents métabolites issus du complexe FeNTA (**Figure 135**). Nous avons alors noté sur les spectres la présence d'un nouveau signal, Y, apparaissant après 11 heures d'incubation et dont l'intensité augmente avec le temps. La structure de ce composé n'a pu être déterminée pour le moment. La **Figure 136** montre l'évolution des concentrations en métabolites du FeNTA au cours du temps.

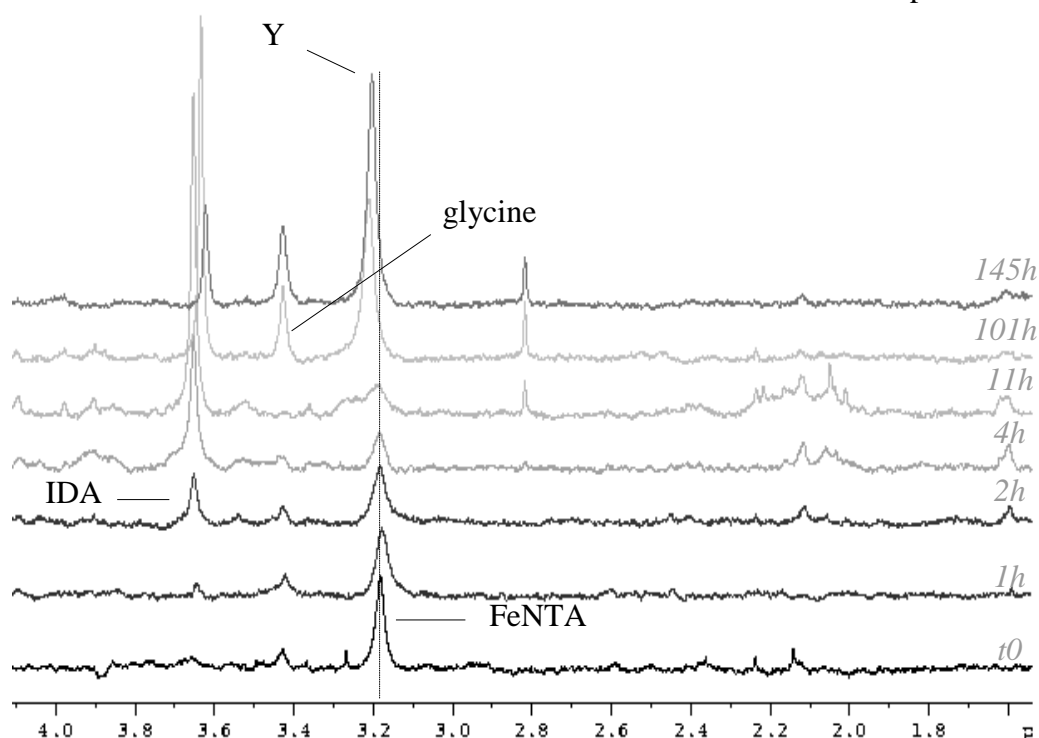


Figure 135 Spectres RMN  $^1\text{H}$  montrant les évolutions des métabolites du FeNTA lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) avec le complexe FeNTA (1 mM), sans lumière

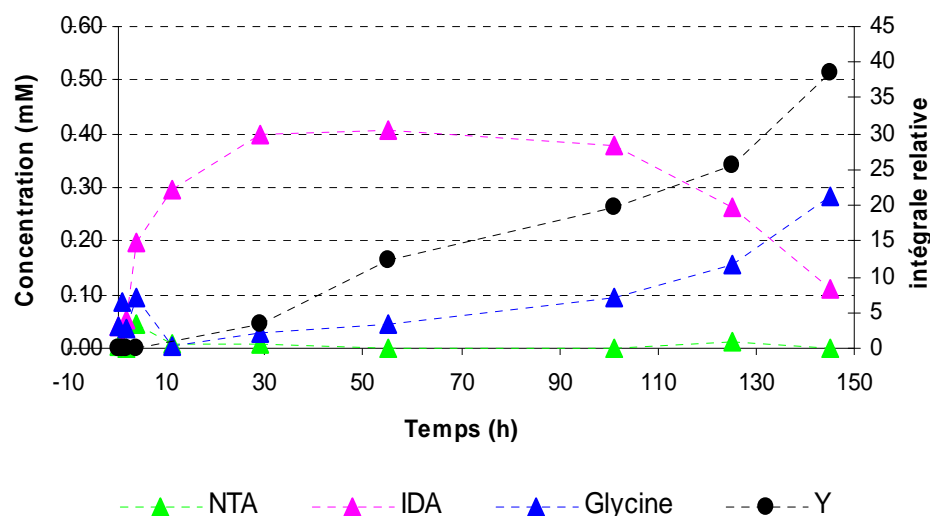


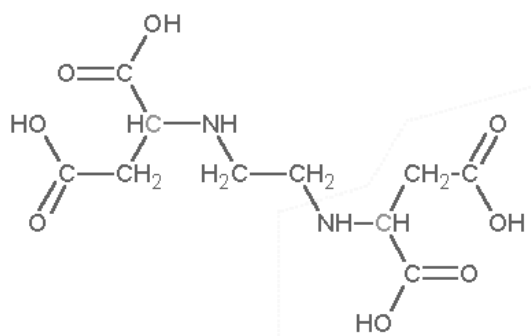
Figure 136 Evolutions des concentrations en NTA après décomplexation, IDA, glycine et de l'intégrale relative de Y d'après l'intégration de spectres RMN  $^1\text{H}$  au cours de l'incubation de *R. rhodochrous* et de l'ABT (0,5 mM) avec le complexe FeNTA (1 mM) en absence de lumière

La **Figure 136** montre que le complexe FeNTA est rapidement et majoritairement dégradé en IDA. Sa concentration atteint un plateau à 0,4 mM après 30 heures d'incubation puis diminue après 90 heures. Le plateau observé correspond très probablement à un équilibre entre la production d'IDA et sa disparition. Nous observons également l'augmentation lente de la concentration en glycine, produit de dégradation de l'IDA. Le composé inconnu Y, quant à lui, augmente avec le temps.

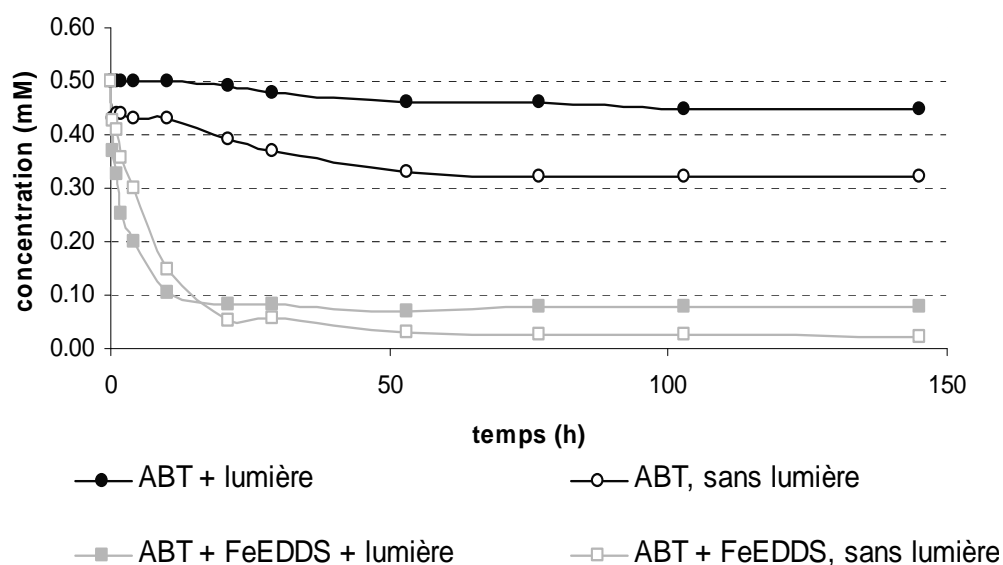
En conclusion, en plus de l'IDA, métabolite du FeNTA, le composé Y ou bien un autre complexant d'origine bactérienne pourrait stabiliser le Fe(II).

### III.1.2 Le complexe FeEDDS

L'EDDS ou acide éthylène diamine dissuccinique est utilisé dans l'industrie du détergeant en remplacement de l'EDTA (peu biodégradable) car il adoucit l'eau en séquestrant certains cations, il est donc présent dans les stations d'épuration. Il est également de plus en plus utilisé pour faire de la phytoremédiation. Il peut aussi être présent naturellement dans les compartiments aquatiques car il est un sidérophore bactérien. La **Figure 137** rappelle sa structure.

Figure 137 *Structure chimique du [S,S]EDDS*

La **Figure 138** montre le suivi de la biodégradation de l'ABT en présence ou en absence du complexe Fe-EDDS. La dégradation est fortement accélérée en présence du complexe. Après 20 heures d'incubation, 96 % d'ABT sont dégradés en absence de lumière contre 84 % en présence de lumière. Par la suite, la concentration en ABT n'évolue plus beaucoup.

Figure 138 *Dégradation de l'ABT (0,5 mM) par R. rhodochrous en présence ou en absence du complexe FeEDDS (1mM), avec ou sans lumière*

La **Figure 139** présente l'évolution des concentrations en 6OHABT et en 4OHABT.

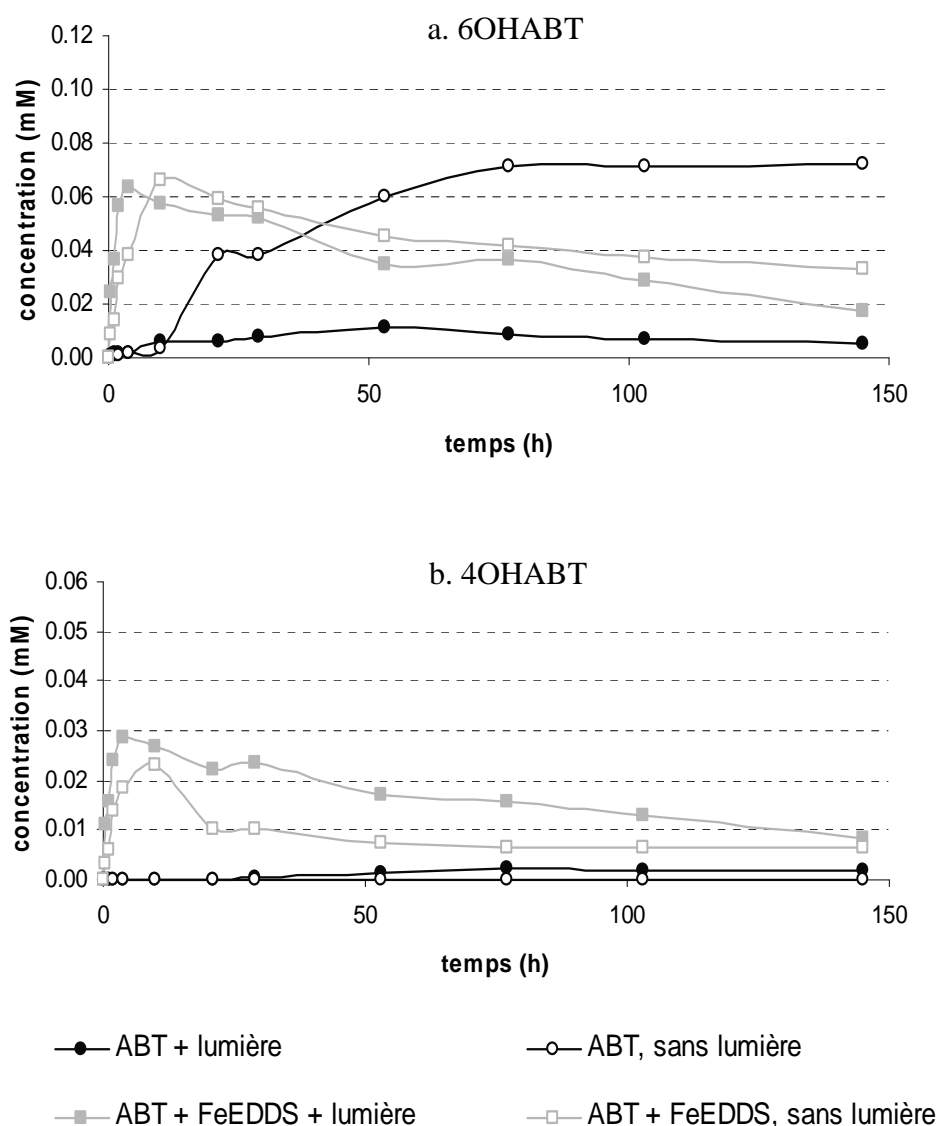


Figure 139 Evolution des concentrations en métabolites 6OHABT (a) et 4OHABT (b) lors de la dégradation de l'ABT (0,5 mM) par *R. rhodochrous* en présence ou en absence du complexe FeEDDS (1 mM), avec ou sans lumière

Les concentrations en 6OHABT et en 4OHABT atteignent rapidement un maximum après 4 heures pour les expériences avec lumière et après 10 heures pour celles sans lumière. En ce qui concerne le 6OHABT, il atteint dans les deux cas un maximum légèrement au dessus de 0,06 mM puis sa concentration diminue progressivement. Quant au 4OHABT, sa concentration maximale atteint 0,03 mM

sous irradiation contre un peu plus de 0,02 mM en absence de lumière. Les deux métabolites sont ensuite dégradés lentement. Les voies métaboliques mises en jeu sont les mêmes que celles observées précédemment avec le complexe FeNTA. Cependant, les dégradations de l'ABT, du 6OHABT et du 4OHABT sont moins efficaces dans le cas FeEDDS que dans le cas FeNTA.

La présence du complexe FeEDDS a accéléré la dégradation de l'ABT, prouvant que la bactérie a pu utiliser le fer sous cette forme ce qui a permis d'une part, la dégradation du 6OHABT et d'autre part, la production et la dégradation du 4OHABT.

La **Figure 140** représente l'évolution des concentrations en fer total et en Fe(II) lors de ces expériences en présence du complexe Fe-EDDS.

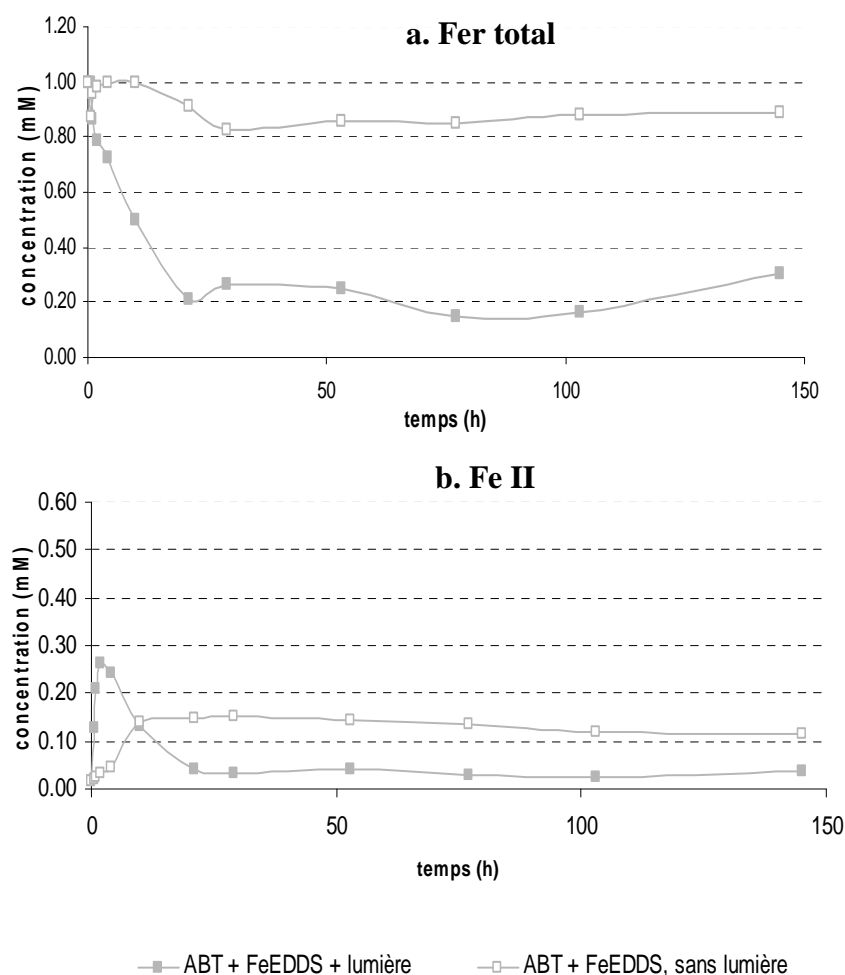


Figure 140 *Evolutions de la concentration en fer total (a) et en Fe(II) (b) lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeEDDS (1 mM) avec et sans lumière*

Sur la **Figure 140a**, nous remarquons une grande différence dans l'évolution de la concentration en fer total entre les expériences avec et sans lumière. 80 % du fer total disparaît en présence de lumière contre 20 % en absence de lumière. Le Fe(II) est beaucoup plus stable en absence de lumière (**Figure 140b**).

Pour les expériences menées en absence de lumière, peu de fer disparaît au cours du temps : sa concentration passe de 1 mM à 0,83 mM en 30 heures puis reste constante. Nous remarquons également une augmentation de la concentration en Fe(II) qui passe de 0 à 0,15 mM lors des 20 premières heures d'incubation et qui se stabilise aux environs de 0,13 mM, suggérant sa complexation par un métabolite bactérien. Cette faible disparition du fer en solution est certainement due à la meilleure complexation du fer par l'EDDS (constante de complexation plus forte) que par le NTA. Ceci peut donc expliquer l'utilisation limitée du fer par les cellules.

En présence de lumière, la concentration en fer total diminue brutalement de 1 mM à 0,2 mM en 20 heures ; en parallèle, la concentration en Fe(II) atteint un maximum de 0,26 mM après 2 heures d'incubation puis diminue rapidement jusqu'à 0,04 mM au bout de 20 heures puis se stabilise. Par conséquent, en présence de lumière, peu de Fe(II) est stabilisé ce qui peut être expliqué soit parce que le complexe bactérien est photodégradé, soit parce que les photoproduits du FeEDDS ne complexent pas le Fe(II).

Nous avons étudié par RMN  $^1\text{H}$  la dégradation de l'EDDS par les cellules en présence ou non de lumière afin de voir si elles utilisaient ce substrat comme source de carbone. La **Figure 141** présente un spectre  $^1\text{H}$  de l'EDDS.

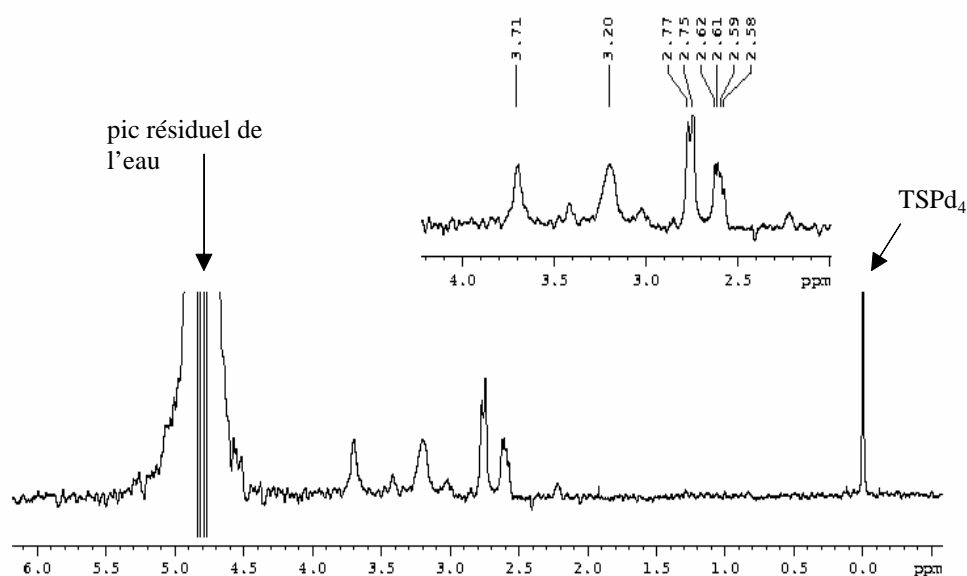


Figure 141 Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'EDDS (1 mM)

La **Figure 142** montre la variation de la concentration en EDDS lors des incubations en présence de *R. rhodochrous*, avec ou sans lumière.

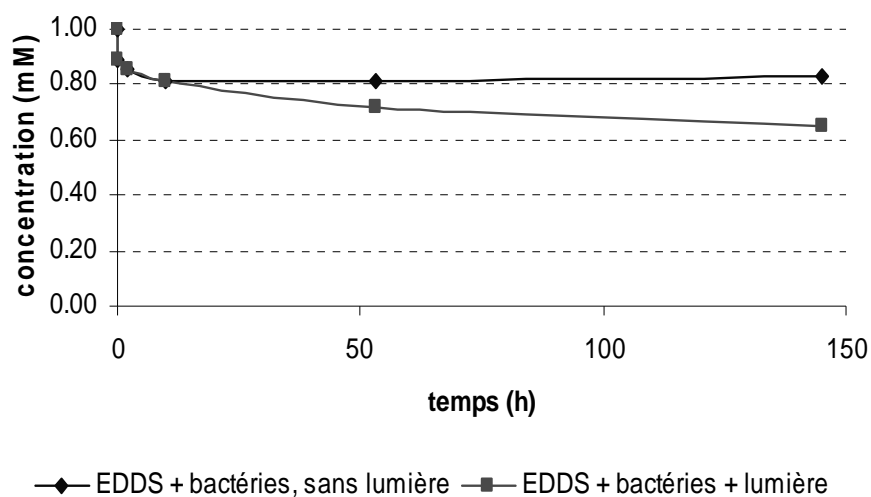


Figure 142 Evolution de la concentration en EDDS (1 mM) au cours du temps lors des expériences cellules + EDDS avec ou sans lumière

- Tout d'abord, nous notons un phénomène d'adsorption sur les cellules au début de l'expérience puisque 10 % d'EDDS disparaissent instantanément au contact des bactéries.

- Ensuite, nous remarquons que les bactéries dégradent faiblement l'EDDS. Les taux de disparition après 145 heures d'incubation sont de 7 % en absence de lumière et de 25 % sous irradiation en tenant compte de l'adsorption. L'EDDS semble donc se dégrader à la lumière ou les bactéries ont un rôle de photoinducteur. Pour confirmer l'une de ces hypothèses, nous avons étudié la dégradation de l'EDDS sans bactérie et en présence ou non de lumière. Le **Tableau 18** montre qu'à l'exception du point à 145 heures (discutable), la concentration en EDDS est constante ce qui montre que ce composé n'est pas photodégradé. Ce résultat est cohérent avec le spectre UV de l'EDDS qui montre que le composé n'absorbe pas au dessus de 300 nm. Nous pouvons donc conclure que la dégradation de l'EDDS en présence à la fois de bactéries et de lumière est due à un phénomène de photoinduction *via* les cellules.

<i>temps (h)</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>10</i>	<i>29</i>	<i>77</i>	<i>145</i>
<i>concentration d'EDDS en mM</i>	1,00	0,99	0,95	0,96	0,96	0,89

Tableau 18 *Evolution de la concentration en EDDS au cours du temps lors de la photodégradation d'EDDS (1 mM)*

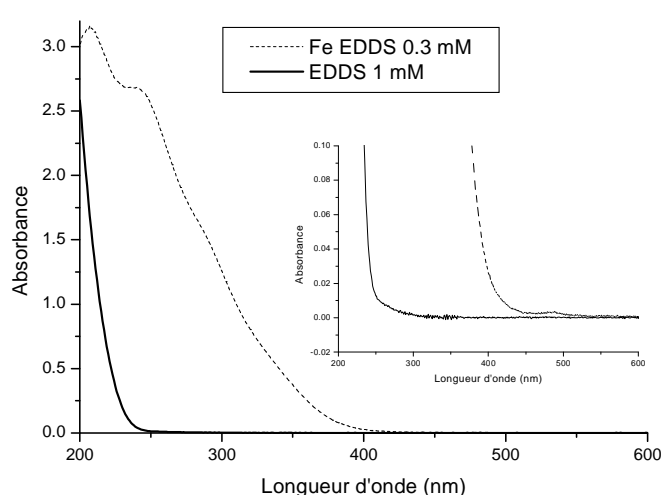


Figure 143 *Spectres UV de l'EDDS (1 mM) et du FeEDDS (0,3 mM)*



Nous avons également suivi par RMN  $^1\text{H}$ , le devenir du complexe FeEDDS avec ou sans lumière au cours de la dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous*. Nous avons d'abord enregistré des spectres pour suivre le devenir du FeEDDS en absence de bactéries, à l'obscurité et à la lumière (**Figure 144**). Le complexe FeEDDS est difficilement observable du fait de la présence de fer, élément paramagnétique qui donne des pics très larges et noyés dans le bruit de fond.

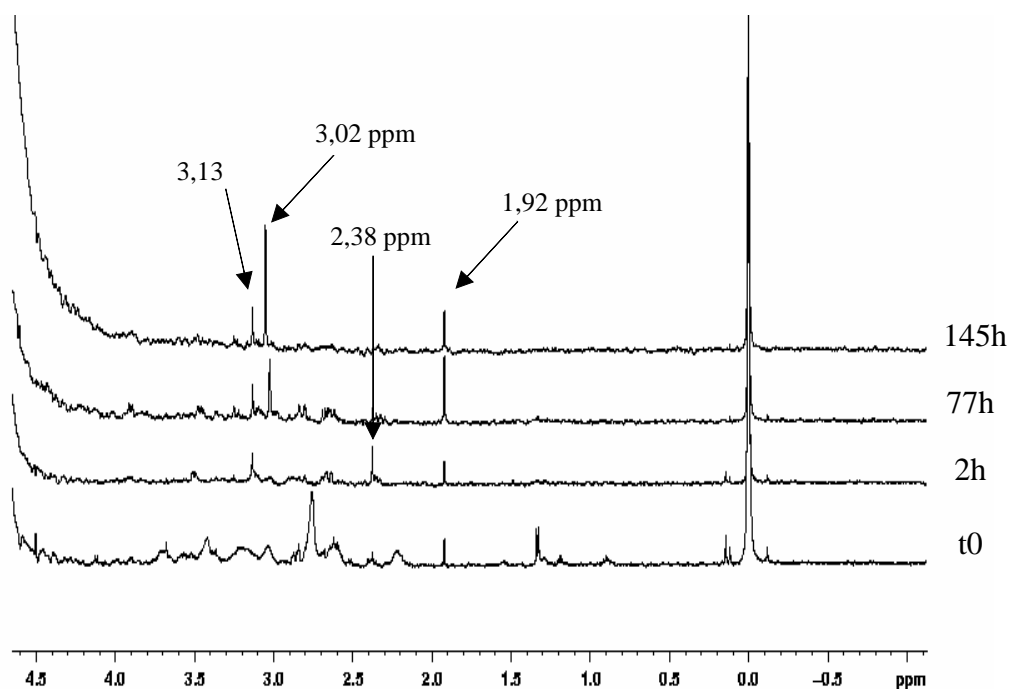


Figure 144 Spectres RMN  $^1\text{H}$  montrant le devenir du FeEDDS (1 mM) sous irradiation

Cependant, nous observons sur les spectres l'apparition de 5 photoproduits principaux :

- trois signaux dont les déplacements chimiques  $\delta = 1,92$  ppm, 2,38 ppm et 8,46 ppm, pourraient correspondre à ceux des protons de l'acétate, du succinate et du formiate respectivement. La formation de ces produits est cohérente avec la structure de l'EDDS. L'ajout d'un standard commercial de ces composés dans le tube de RMN devrait permettre une identification formelle.
- deux singulets à  $\delta = 3,02$  ppm et  $\delta = 3,13$  ppm, pouvant correspondre aux protons de deux composés azotés

L'évolution de ces 5 photoproduits de l'EDDS est présentée sur la **Figure 145**.

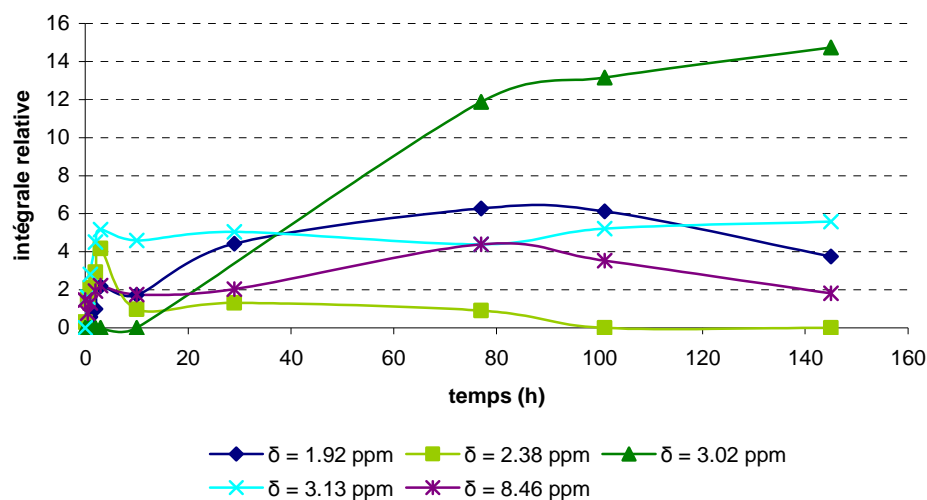


Figure 145 Evolution des intégrales des photoproduits issus du complexe FeEDDS (1 mM)

Aucune dégradation du complexe FeEDDS n'est observée à l'obscurité.

Le devenir du complexe a ensuite été suivi lors de la dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* en présence ou non de lumière. Les spectres obtenus en absence de lumière sont présentés **Figure 146**.

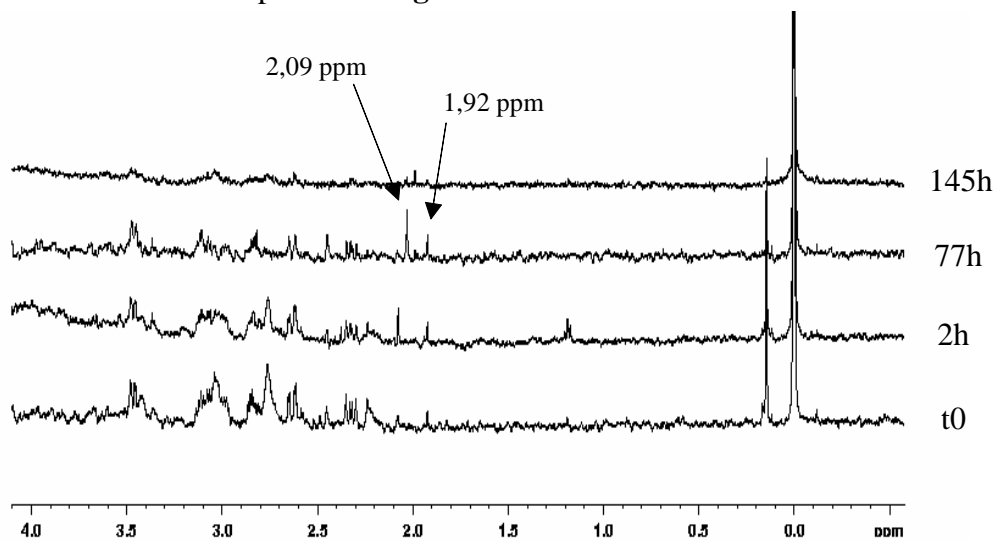


Figure 146 Spectres RMN  $^1\text{H}$  montrant l'évolution du FeEDDS (1 mM) lors de la biodégradation de l'ABT à l'obscurité

Nous ne voyons apparaître que trois métabolites sous forme de singulets, à  $\delta = 1,92$  ppm (acétate), à  $\delta = 2,09$  ppm et  $\delta = 8,46$  ppm (formiate), mais ils ne sont qu'en très faibles quantités ce qui implique soit que le complexe FeEDDS a été peu métabolisé par *R. rhodochrous*, soit que les métabolites produits sont très vite dégradés par les bactéries (il s'agit d'intermédiaires classiques du métabolisme bactérien). La première hypothèse est par ailleurs en accord avec le fait que très peu de fer ait été consommé lors de la biodégradation d'ABT en absence de lumière et en présence du complexe FeEDDS. Le complexe FeEDDS serait donc très stable en solution.

Nous avons également suivi le devenir du complexe FeEDDS lors de la biodégradation de l'ABT en présence de lumière. Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  obtenus (**Figure 147**) montrent la présence de 5 produits de dégradation ( $\delta = 1,99$  ppm ; 2,03 ppm ; 3,13 ppm ; 3,30 ppm, 3,47 ppm). Nous avons reporté l'évolution de leurs concentrations sur le graphique de la **Figure 148**.

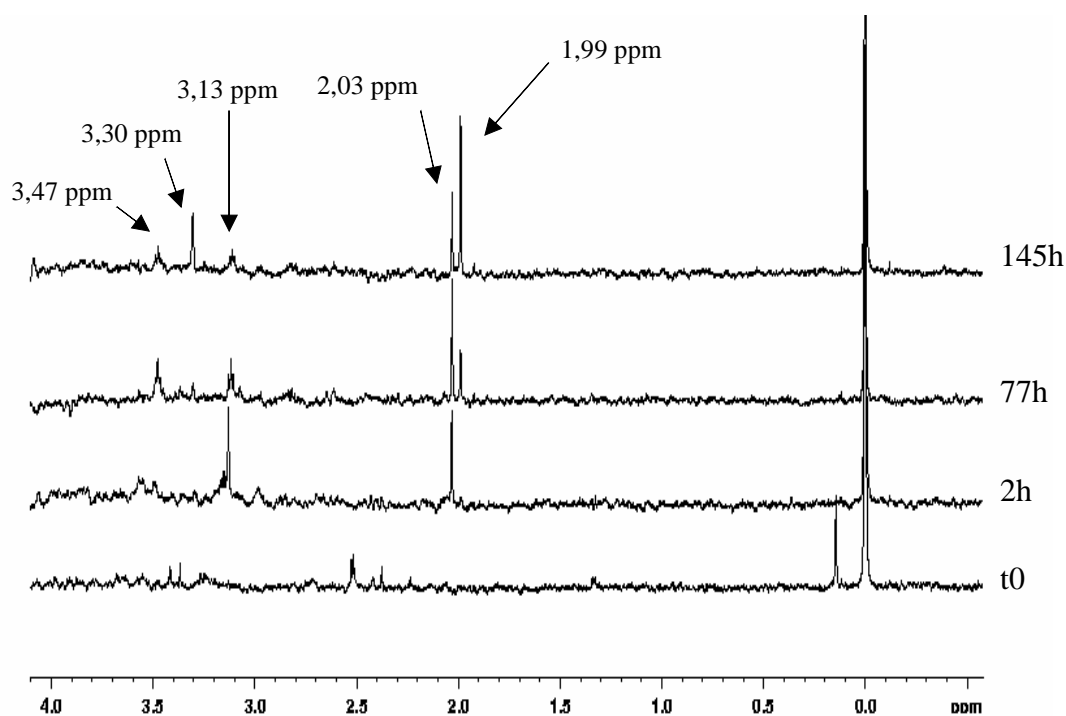


Figure 147 Spectre RMN  $^1\text{H}$  montrant le devenir du FeEDDS (1 mM) lors de son incubation en présence de bactéries, d'ABT et de lumière

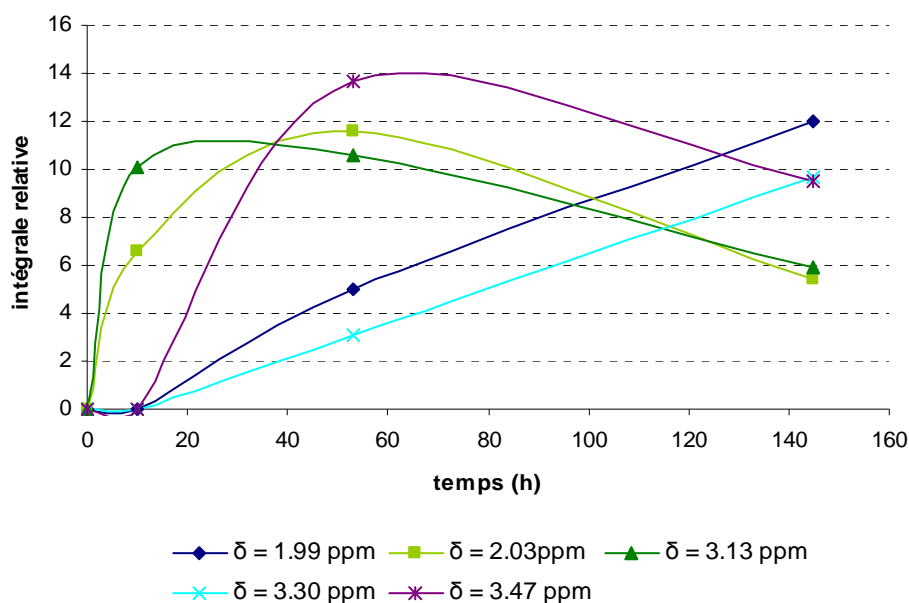


Figure 148 Evolution des concentrations des produits de dégradation issus du complexe FeEDDS (1 mM) lors de son incubation en présence de lumière et d'ABT (0,5 mM)

Nous retrouvons le signal à  $\delta = 3,13$  ppm que nous avons vu uniquement dans l'expérience FeEDDS en présence de lumière. Ce signal correspond donc uniquement à un photoproduit de l'EDDS. Nous n'avons pas observé de formiate. Il a sans doute été produit mais a pu très vite être dégradé par la lumière et/ou par les cellules. Les signaux à  $\delta = 1,99$  ppm ; 2,03 ppm ; 3,30 ppm et 3,47 ppm, n'avaient pas été observés précédemment, ni lors de la photodégradation du FeEDDS, ni lors de sa biodégradation.

Pour conclure, d'après les analyses RMN  $^1\text{H}$  et les résultats des dosages du fer, nous en déduisons :

- que le complexe est sans doute peu utilisé par les cellules alors que nous observons une bonne dégradation de l'ABT
- il n'y a sans doute pas besoin de grandes quantités de fer pour activer les enzymes qui dégradent l'ABT ce qui est en accord avec les résultats de Bunescu (2006) qui avait montré que seulement 18 % du fer étaient internalisés dans le cas du FeNTA (1 mM).

### III.1.3 Le complexe Fe-citrate

La **Figure 149** présente la structure du citrate. L'acide citrique est très répandu dans la nature. On le trouve dans de nombreuses plantes, chez certains animaux et dans le sol. Ce composé est, en effet, un intermédiaire très important dans le métabolisme, il intervient dans le cycle de Krebs (dont l'autre nom est d'ailleurs le cycle de l'acide citrique). L'acide citrique est très utilisé dans l'industrie alimentaire, dans certaines boissons (limonade), pour leur donner un goût agréable et aussi dans les détergents pour complexer les métaux.

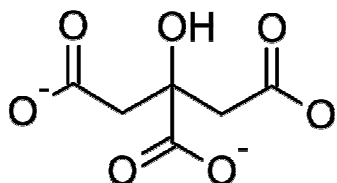
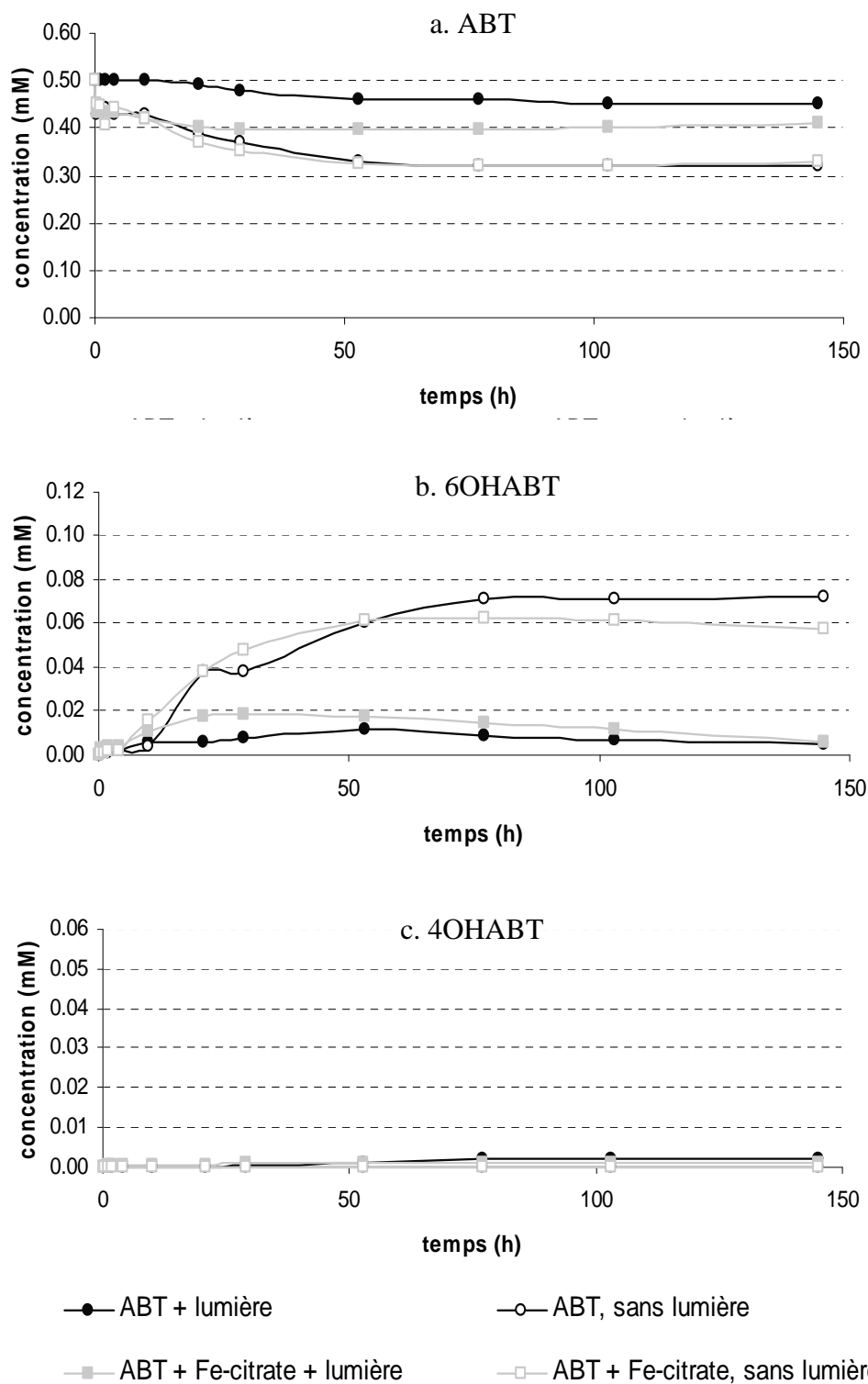


Figure 149      Structure du citrate

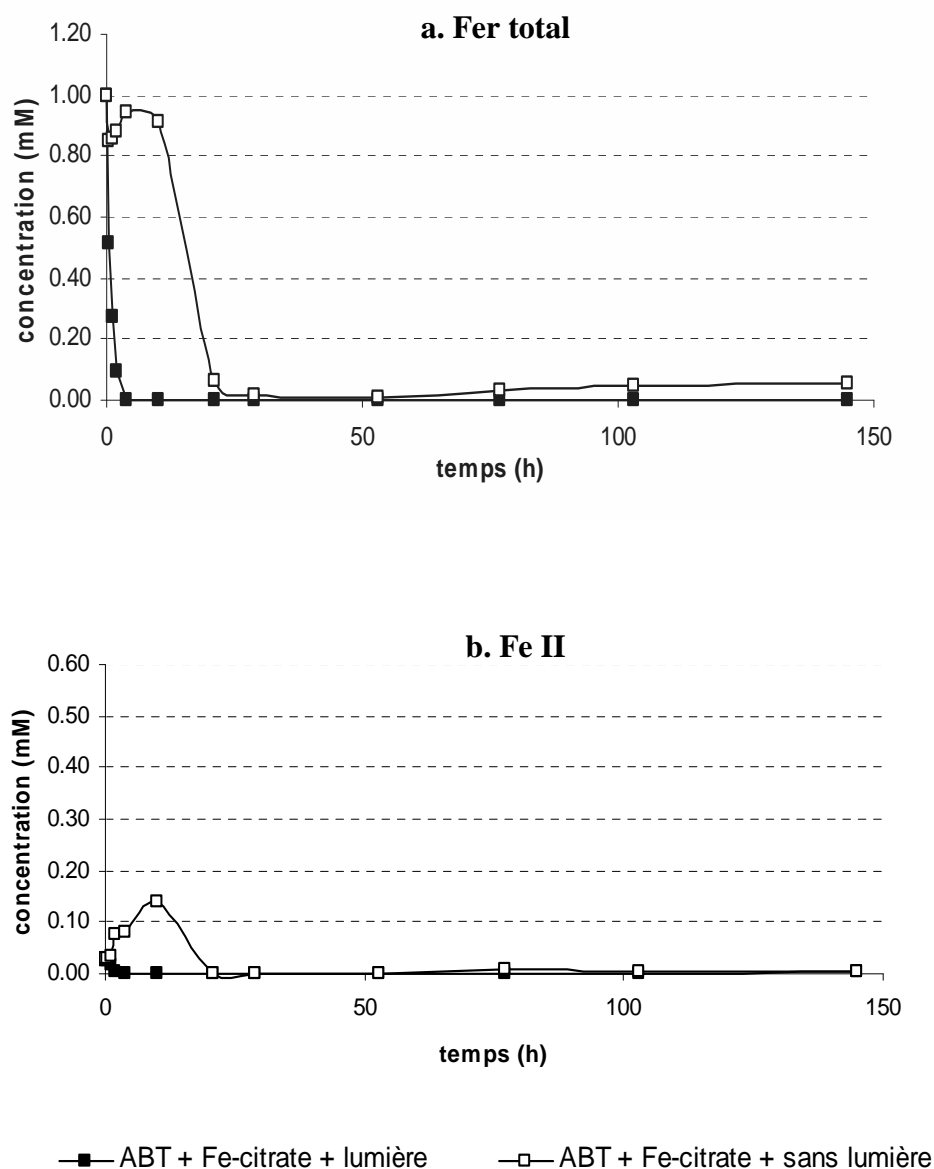
La **Figure 150** donne les évolutions des concentrations en ABT, en 6OHABT et en 4OHABT lors de la dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* en présence du complexe Fe-citrate.



**Figure 150** *Evolutions des concentrations en ABT (a), en 6OHABT (b) et en 4OHABT (c) lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence du complexe Fe-citrate (1 mM) avec ou sans lumière*

Nous observons d'après la **Figure 150**, que la présence du complexe Fe-citrate n'a pas d'impact sur la dégradation de l'ABT puisque les courbes sont très proches de celles du témoin ; il en est de même pour le 6OHABT et le 4OHABT.

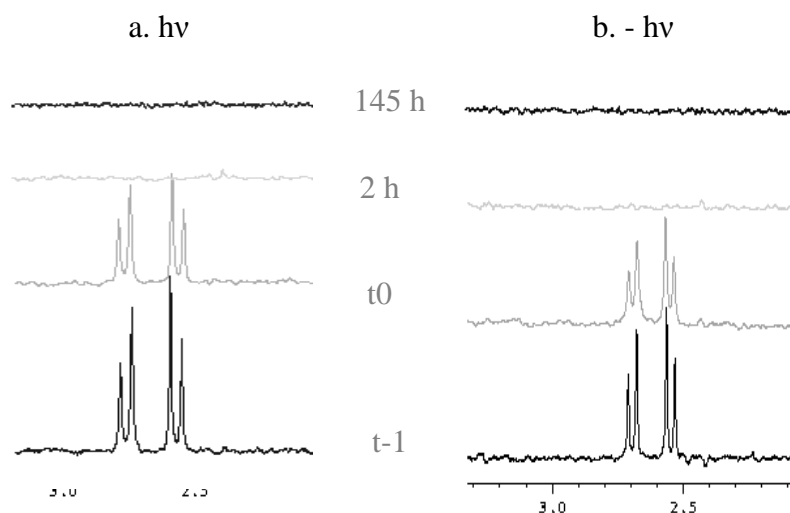
Nous avons également suivi le devenir du fer (**Figure 151**).



*Figure 151*      *Evolutions des concentrations en fer total (a) et en Fe(II)(b) lors de la biodégradation d'ABT (0,5 mM) en présence du complexe Fe-citrate (1 mM), avec ou sans lumière*

Les **Figure 151a** et **Figure 151b** montrent que le fer en solution disparaît très vite dans l'expérience Fe-citrate en présence de lumière. En présence de lumière et à  $\text{pH} \geq 7$ , le Fe-citrate n'est pas stable, il est très vite décomplexé et donne du Fe(II). Or, nous n'observons pas de Fe(II) ce qui signifie qu'il n'y a pas d'agent complexant dans le milieu pour le stabiliser. Il est en fait réoxydé très rapidement en Fe(III) qui précipite sous forme  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s})$ . En absence de lumière, la décomplexation du Fe-citrate a été limitée au début de l'expérience mais au fil de l'incubation, le pH augmente et devient supérieur à 7 (car *R. rhodochrous* basifie le milieu) ce qui entraîne la décomplexation puis la précipitation du fer. Cependant, le fait que nous observions du Fe(II) dans les dix premières heures d'incubation (maximum à 0,15 mM) montre que les bactéries sont aussi capables de réduire le Fe(III) en Fe(II) et donc d'utiliser le complexe Fe-citrate mais à un degré moindre car il n'est pas très stable à ces pH donc moins disponible.

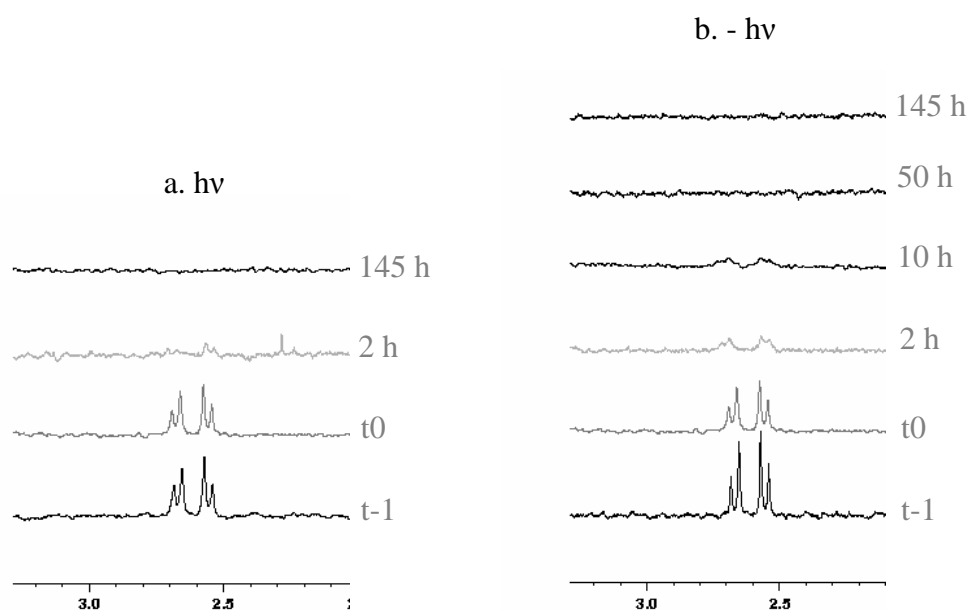
Nous avons voulu savoir si le citrate était dégradé par les bactéries. La **Figure 152** met en évidence la métabolisation rapide du citrate par *Rhodococcus rhodochrous* (en moins de 2 heures), le citrate entrant rapidement dans le cycle de Krebs au cours duquel il est transformé en  $\text{CO}_2$ .



**Figure 152** Suivi par RMN  $^1\text{H}$  de la dégradation du citrate ( $C = 1 \text{ mM}$ ) par *R. rhodochrous* en présence (a) et en absence (b) de lumière



Nous avons également suivi la dégradation du complexe Fe-citrate en présence des cellules, avec ou sans irradiation. Si nous comparons les résultats présentés **Figure 153** avec ceux de la **Figure 152**, ils montrent que le citrate est consommé un peu moins vite lorsqu'il est complexé.



**Figure 153** *Suivi par RMN  $^1\text{H}$  de la dégradation du complexe Fe-citrate (1mM) par R. rhodochrous en présence (a) et en absence (b) de lumière*

Nous pouvons conclure qu'avec le Fe-citrate, tout se passe très vite car le complexe n'est pas stable. Après décomplexation, le citrate est très rapidement métabolisé par les cellules ; quant au fer, il précipite très vite ce qui ne laisse pas le temps aux cellules de l'utiliser. Il faut également noter qu'aucun métabolite du citrate n'a été mis en évidence par RMN  $^1\text{H}$  dans le milieu ce qui implique l'absence d'agents potentiellement complexants du Fe(II) issus du citrate. Par contre, la stabilisation partielle et temporaire du Fe(II) en présence de bactéries et en absence de lumière (**Figure 151**) confirme bien la présence d'un agent complexant d'origine bactérienne déjà évoqué.

### III.1.4 Comparaison de la dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* avec les trois complexes organiques de fer testés: FeNTA, FeEDDS et Fe-citrate

Nous avons reporté sur le même graphique les courbes de dégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* en présence des trois complexes organiques de fer testés : FeNTA, FeEDDS et Fe-citrate, en présence ou non de lumière (**Figure 154** et **Tableau 19**).

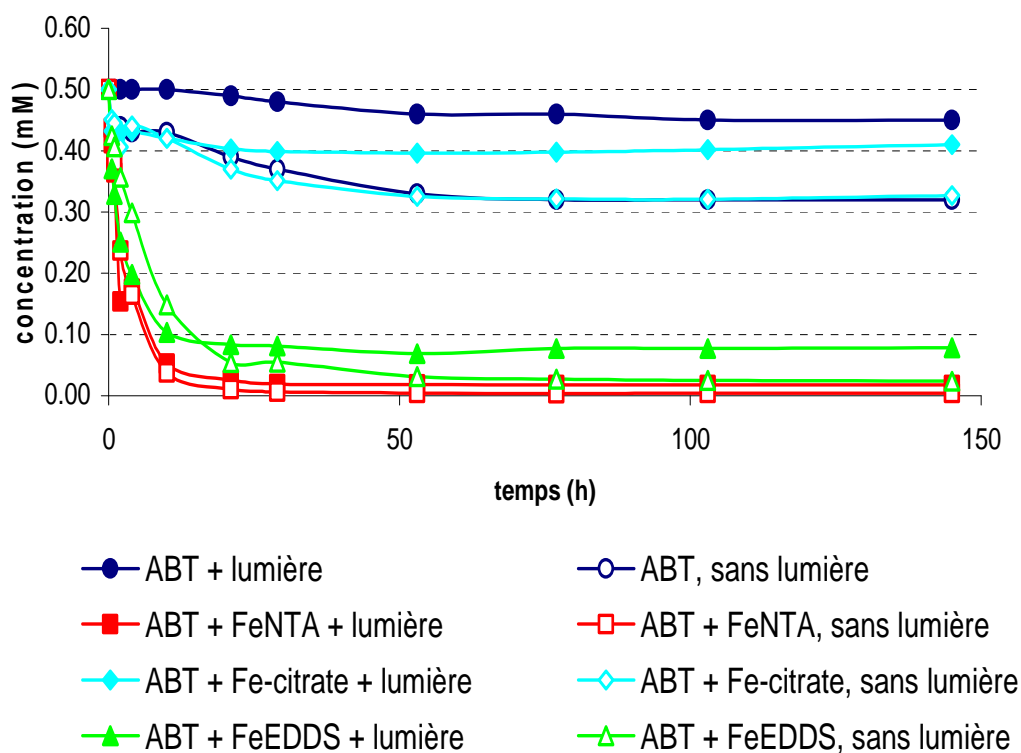


Figure 154 *Cinétiques de biodégradation de l'ABT (0,5 mM) avec ou sans lumière et en présence ou non des différents complexes de fer (1 mM) FeNTA ; Fe-citrate et FeEDDS*

<b>FeNTA - <math>h\nu</math></b>	100 % (après 30h)	<b>FeNTA + <math>h\nu</math></b>	96 % (après 30h)
<b>FeEDDS - <math>h\nu</math></b>	96 % (après 20h)	<b>FeEDDS + <math>h\nu</math></b>	84 % (après 20h)
<b>- <math>h\nu</math></b>	36 % (après 145h)	<b>+ <math>h\nu</math></b>	10 % (après 145h)
<b>Fe-citrate - <math>h\nu</math></b>	34 % (après 145h)	<b>Fe-citrate + <math>h\nu</math></b>	18 % (après 145h)

Tableau 19 Pourcentages de dégradation de l'ABT (0,5 mM) par *R. rhodochrous* avec ou sans lumière et en présence ou non de FeNTA (1 mM), de Fe-citrate (1 mM) ou de FeEDDS (1 mM)

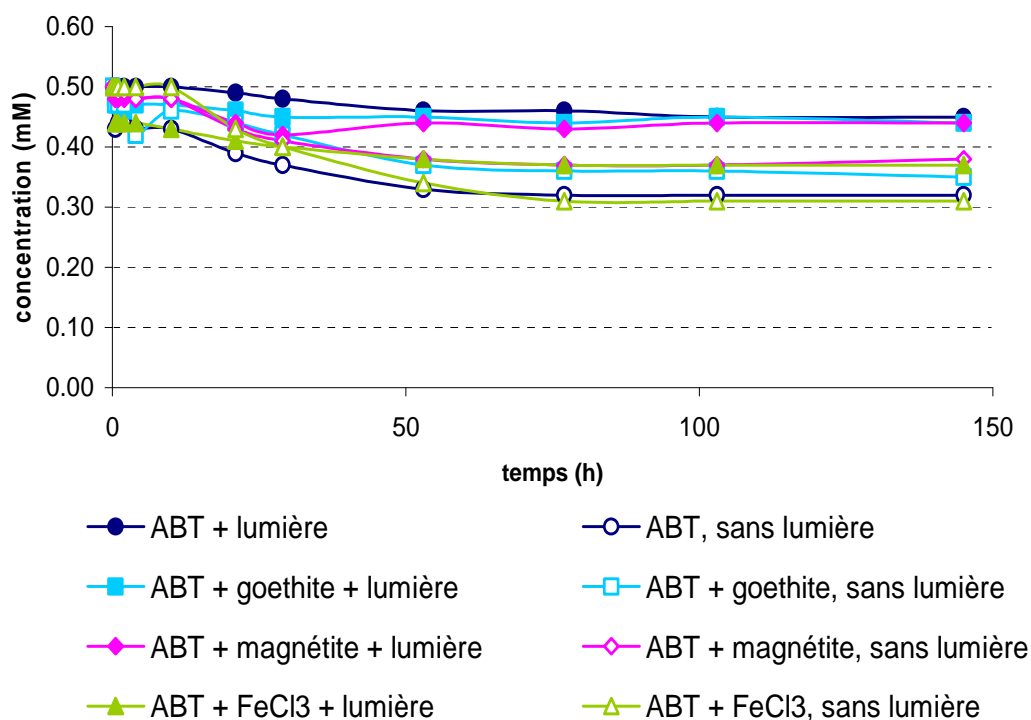
Le complexe FeNTA est donc le plus efficace en terme d'accélération de la dégradation par *Rhodococcus rhodochrous* de l'ABT, mais les résultats sont également très bons avec le complexe FeEDDS. En revanche, les résultats obtenus avec le Fe-citrate sont proches de ceux obtenus en absence de complexe de fer.

Un effet négatif général de la lumière est observé sur la dégradation. Nous avons vu grâce à la RMN *in vivo*, que la présence de lumière n'avait pas d'influence sur l'état énergétique de la bactérie. Il faut cependant noter que les conditions d'irradiation sont différentes. En effet, pour la RMN *in vivo*, les bactéries sont soumises à des irradiations qui reproduisent le spectre solaire et qui sont moins agressives que celles du photobioréacteur dans lequel se déroulent les expériences en batch et dont le spectre lumineux reproduit surtout les UV présents dans le spectre solaire.

### III.2 Les oxydes ou oxy(hydr)oxydes de fer

Les oxydes ou oxy(hydr)oxydes de fer sont des formes sous lesquelles le fer est majoritairement présent dans la nature. Nous avons souhaité savoir si sous ces formes, le fer pouvait également être utilisé par *R. rhodochrous*. Pour cela, nous avons étudié la biodégradation de l'ABT en présence de: goethite ( $\alpha$ -FeO(OH)), magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s})$  formé lorsque du  $\text{FeCl}_3$  est placé dans l'eau à pH = 7,0.

Nous avons suivi la cinétique de dégradation de l'ABT dans chacun des cas (**Figure 155**).



*Figure 155* Dégradation de l'ABT (0,5 mM) par *R. rhodochrous* avec ou sans lumière et en présence ou non de goethite (éq. 1 mM en fer), de magnétite (éq. 1 mM en fer) et de FeCl<sub>3</sub> (1 mM)

La dégradation de l'ABT est toujours plus importante en absence de lumière que sous irradiation. Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de lumière ralentit légèrement le métabolisme microbien. La dégradation de l'ABT n'est pas favorisée par la présence de ces oxydes et oxy(hydr)oxydes de fer à l'exception du cas FeCl<sub>3</sub> en présence de lumière. Le **Tableau 20** reprend les concentrations en ABT dans chacun des milieux après 145 heures d'incubation.

<b><math>FeCl_3 - h\nu</math></b>	38 %	<b><math>FeCl_3 + h\nu</math></b>	26 %
<b><math>- h\nu</math></b>	36 %	<b><math>h\nu</math></b>	10 %
<b><i>goethite</i> - <math>h\nu</math></b>	30 %	<b><i>goethite</i> + <math>h\nu</math></b>	12 %
<b><i>magnétite</i> - <math>h\nu</math></b>	24 %	<b><i>magnétite</i> + <math>h\nu</math></b>	12 %

Tableau 20 Pourcentages de biodégradation de l'ABT après 145 heures d'incubation en présence ou non d'oxydes et d'oxy(hydr)oxydes de fer, avec ou sans lumière

Les cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites de l'ABT ont été étudiées par HPLC. La **Figure 156a** met elle aussi en évidence l'effet de la lumière : lorsque les expériences sont réalisées sous irradiation, les concentrations en 6OHABT sont les plus faibles ; ceci est en accord avec le fait que sous irradiation l'ABT est moins dégradé mais aussi que le 6OHABT est phototransformé. La **Figure 156a** fait apparaître clairement deux groupes de comportements : le premier groupe, dont les courbes se superposent quasiment, englobe le témoin et les expériences avec la goethite et la magnétite. Le cas de  $FeCl_3$  se distingue de ce groupe. D'un point de vue général, nous remarquons qu'en présence ou non de lumière, le 6OHABT est produit dans les 4 expériences mais dans des concentrations plus importantes pour le cas  $FeCl_3$ . Nous remarquons également que pour les expériences sans lumière, le 6OHABT s'accumule dans le milieu pour les 4 cas alors qu'en présence de lumière, il est dégradé. La **Figure 156b** montre des concentrations très faibles en 4OHABT. Le 4OHABT est présent dans le cas du témoin et de  $FeCl_3$  en présence de lumière. Cependant et d'un point de vue qualitatif seulement car les concentrations étaient bien trop faibles pour être quantifiées avec précision, le métabolite est apparu sur les chromatogrammes de toutes les expériences réalisées en présence de lumière.

Dans la partie précédente sur les complexes organiques de fer, nous avons conclu que pour dégrader le 6OHABT et produire le 4OHABT, les bactéries devaient être en présence de lumière et/ou en présence de fer. Ainsi, dans les cas FeNTA et FeEDDS sans lumière, nous avons observé la dégradation du 6OHABT et la production de 4OHABT. Dans les expériences menées en absence de lumière mais en présence de goethite et de magnétite, nous n'observons ni la dégradation du 6OHABT, ni la production de 4OHABT ce qui nous amène à conclure que dans ces cas-là, le fer n'a pas été utilisé par les bactéries.

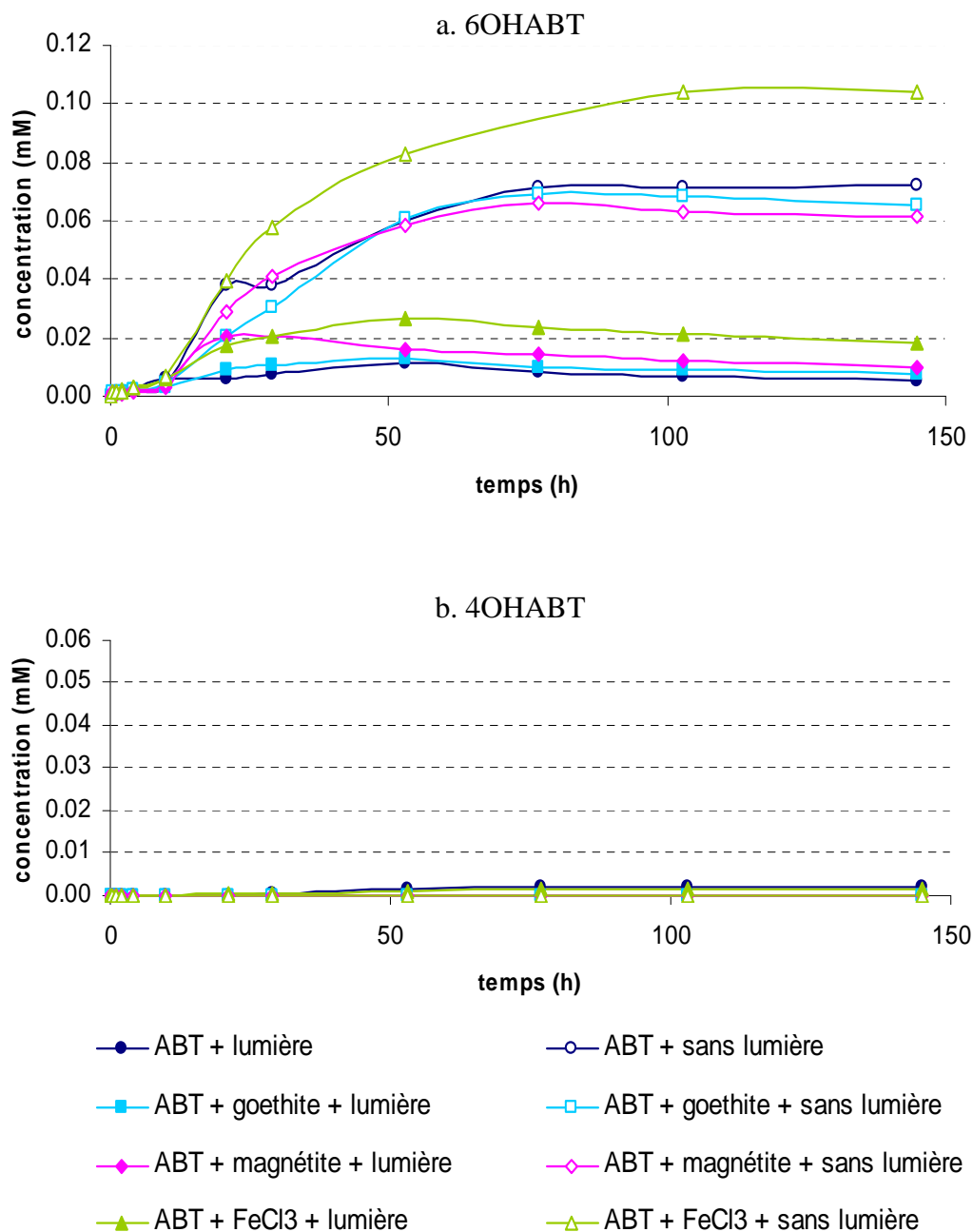


Figure 156 Evolutions des concentrations en 6OHABT (a) et en 4OHABT (b) lors de la biodégradation d'ABT en présence ou non de goethite (éq. 1 mM en fer), de magnétite (éq. 1 mM en fer) et de FeCl<sub>3</sub> (1 mM), avec et sans lumière

La **Figure 157** présente l'évolution des concentrations en fer total et en Fe(II) au cours de ces expériences.

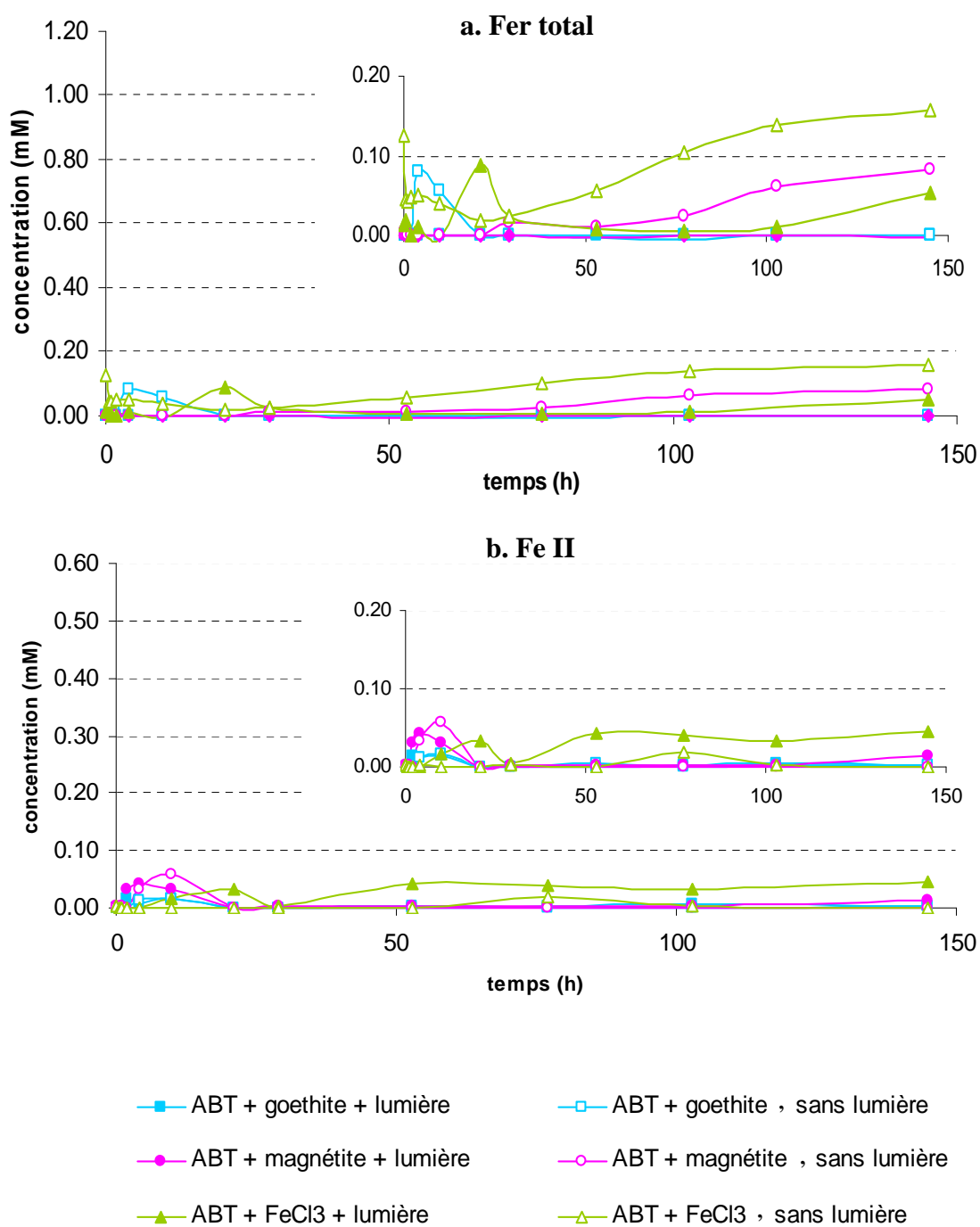
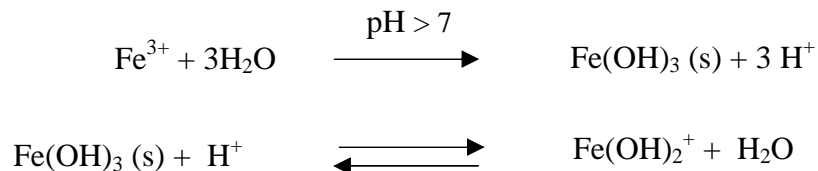


Figure 157 *Evolutions des concentrations en fer total (a) et en Fe(II)(b) lors de la biodégradation d'ABT (0,5 mM) en présence de goethite (ég. 1 mM en fer), de magnétite (ég. 1 mM en fer) et de FeCl<sub>3</sub> (1 mM), avec ou sans lumière*

La **Figure 157a** montre que dans tous les cas, très peu de fer est soluble, les concentrations étant cependant un peu plus élevées en absence de lumière. Nous observons, d'après la **Figure 157b**, qu'il y a également très peu de Fe(II) en solution. Notons que sa concentration est cependant plus importante dans le cas FeCl<sub>3</sub> en présence de lumière.

Si nous détaillons maintenant les différents cas, nous observons qu'avec la goethite et la magnétite, le fer n'est pas soluble et qu'il n'a donc pas pu être internalisé par les cellules. Ceci est cohérent avec le fait que l'ABT ait été peu dégradé, c'est-à-dire dans des ratios similaires à ceux du témoin, et que les concentrations en 6OHABT et 4OHABT sont très proches de celles du témoin. Le cas FeCl<sub>3</sub> est un peu différent. En effet, nous pouvons voir sur la **Figure 155** et dans le **Tableau 20** que la dégradation de l'ABT est légèrement favorisée lorsque FeCl<sub>3</sub> est présent et sous irradiation. En effet, après 145 heures d'incubation, 24 % d'ABT est dégradé en présence de FeCl<sub>3</sub> et de lumière contre 10 % seulement dans le cas du témoin. Cette amélioration de la dégradation de l'ABT n'est pas significative dans le cas sans lumière puisque nous atteignons un pourcentage de dégradation de 38 % en présence de FeCl<sub>3</sub> et de 36 % dans le témoin. Lorsque FeCl<sub>3</sub> est en solution, l'équilibre suivant est finalement présent :



L'espèce Fe(OH)<sub>3</sub>(s) est la première espèce de fer particulière qui se forme lorsqu'on dissout du fer ferrique dans l'eau à des pH >5,0. Cette espèce qui n'est pas organisée, ni cristallisée, est en équilibre avec la forme soluble Fe(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>. Pour des pH ≥ 7,0, cet équilibre est très en faveur de la forme Fe(OH)<sub>3</sub>(s) mais on ne peut pas exclure la présence de Fe(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup> (quelques μM). Cette observation permet de comprendre pourquoi en présence de lumière, la dégradation de l'ABT est plus importante ; en effet, la forme Fe(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup> est une forme très photoactive qui produit des radicaux hydroxyle sous irradiation.

### III.3 Conclusion

Nous sommes partis de la constatation qu'en présence du complexe FeNTA, les cinétiques de biodégradation de l'ABT par *R. rhodochrous* étaient



fortement accélérées avec une disparition quasi complète de l'ABT. Nous avons vu que le chélatant NTA n'était pas dégradé par les bactéries lorsqu'il était seul mais qu'il l'était en revanche lorsqu'il était sous la forme complexée FeNTA. Cette observation nous a laissés penser que la bactérie internalisait le complexe FeNTA et qu'alors elle pouvait utiliser le fer. Nous avons donc cherché à savoir si le fer pouvait être internalisé sous d'autres formes. Ainsi nous avons travaillé d'une part avec d'autres complexes organiques et d'autre part avec des oxydes ou oxy(hydr)oxydes de fer.

Nous pouvons conclure, d'après les expériences décrites précédemment, que pour être utilisé par *Rhodococcus rhodochrous*, le fer doit être disponible, c'est-à-dire qu'il doit être soluble. Il doit donc être sous forme de complexe stable aux conditions de pH du milieu. Si le complexe n'est pas stable ou que l'agent complexant est dégradé par la bactérie, comme c'est le cas du citrate pour le complexe Fe-citrate, alors le fer précipite rapidement et n'est donc plus disponible pour la cellule. Les complexes FeNTA et FeEDDS ont quant à eux des constantes de complexation élevées, respectivement  $\log K = 15,9$  et  $\log K = 22,0$ , qui permettent d'éviter une décomplexation trop rapide à des pH élevés (7 à 9).

Plusieurs possibilités sur l'utilisation et le devenir du fer sont donc envisageables en fonction des conditions de pH et de la nature du processus mis en jeu, à savoir microbiologique ou photochimique. Le schéma de la **Figure 158** résume les différentes voies possibles du devenir du fer.

- voie 1 : le fer est sous forme d'oxydes ou d'oxy(hydr)oxydes non soluble, et dans ce cas il n'est pas disponible pour la cellule
- voie 2 : le fer n'est pas complexé ou il est sous forme complexée  $\text{Fe}^{3+}\text{L}$  mais ce complexe est instable au pH du milieu. Le fer précipite donc sous forme d'hydroxyde  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s})$  et devient indisponible pour la bactérie.
- voie 3 : le fer est sous forme complexée  $\text{Fe}^{3+}\text{L}$  et ce complexe est stable au pH du milieu. Dans ce cas, le Fe(III) est réduit en Fe(II) de deux manières :
  - 1) soit photochimiquement. Il y a alors production des radicaux  $\cdot\text{OH}$  en parallèle qui vont attaquer l'ABT.
  - 2) soit microbiologiquement. Le Fe(II) active certaines enzymes de *R. rhodochrous* ce qui favorise la dégradation de l'ABT.

A partir de là, le Fe(II) peut :

- soit se réoxyder en Fe(III) si il n'est pas stabilisé par un complexant et alors précipiter sous forme de  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s})$
- soit être complexé par un ligand  $\text{L}_{\text{deg}}$  issu de la dégradation photochimique ou microbiologique du ligand L de départ
- soit être complexé par un ligand  $\text{L}_{\text{cell}}$  produit par la cellule

Le ou les complexes de Fe(II) formés,  $\text{Fe}^{2+}\text{L}_{\text{deg}}$  et/ou  $\text{Fe}^{2+}\text{L}_{\text{cell}}$ , pourront finalement se décomplexer au cours du temps en présence de lumière et/ou à cause des conditions physico-chimiques du milieu, redonnant du Fe(III) qui précipitera ensuite sous forme de  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s})$ .

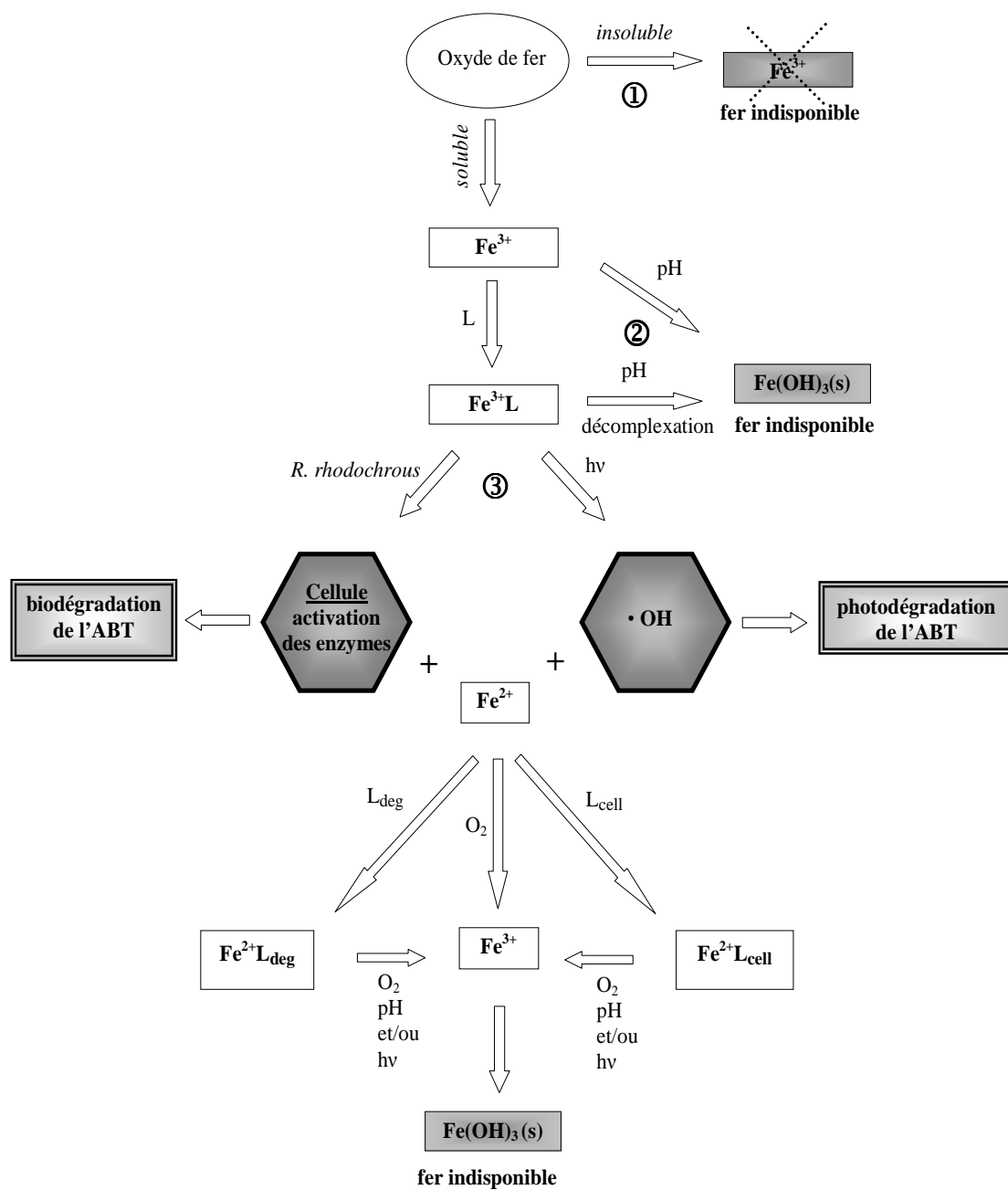


Figure 158 Schéma montrant l'utilisation et le devenir du fer (L : ligand présent dans le milieu aqueux ; L<sub>deg</sub> : ligand issu de la dégradation photochimique ou microbiologique de L ; L<sub>cell</sub> : ligand produit par la cellule)

## **Chapitre 5**

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent une contribution significative d'une part à la connaissance du métabolisme d'une souche microbienne de l'environnement *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 et d'autre part à la compréhension des mécanismes de bio- et photodégradation du 2-aminobenzothiazole en présence de fer.

Une étude originale des bactéries réalisée par RMN *in vivo* du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{31}\text{P}$  nous a permis de mettre en évidence différentes propriétés métaboliques intéressantes pour les mécanismes de biodégradation dans les conditions environnementales. L'étude du métabolisme du phosphore, qui donne accès à des indicateurs du métabolisme énergétique comme le pH intracellulaire et la concentration en ATP, a montré que cette bactérie était résistante à une exposition aux UV présents dans le spectre solaire et à une anaérobiose prolongée. De plus, le métabolisme phosphoré de *Rhodococcus rhodochrous* n'est pas perturbé par la présence de l'ABT, du FeNTA et de leurs produits de dégradation ni par l'immobilisation des cellules dans des billes d'alginate. Enfin cette étude par RMN *in vivo* du phosphore a mis en évidence que cette bactérie avait des réserves importantes en polyphosphates qui contribuent à réguler les réactions de phosphorylation et déphosphorylation des métabolites cellulaires. L'étude par RMN *in vivo* du carbone couplée à l'utilisation de glucose enrichi en  $^{13}\text{C}$ , montre la synthèse de tréhalose chez cette bactérie. L'analyse des isotopomères  $^{13}\text{C}$  du tréhalose montre que ce composé peut être synthétisé soit par voie directe soit après réversion de la glycolyse. Ce tréhalose est important pour cette bactérie car d'un part il peut servir de réserve de produit carboné et d'autre part car il est le motif de base pour la synthèse de surfactants. Ces surfactants présent à la surface des bactéries permettent de solubiliser des polluants afin de faciliter leur biotransformation.

La deuxième partie du travail de cette thèse a montré l'impact important que pouvait avoir le fer sur l'activation des voies de biotransformation et de phototransformation du 2-aminobenzothiazole. Une importante augmentation de la transformation de ce polluant est observée quand le fer est présent sous forme stable et soluble dans l'eau. En effet cette condition est nécessaire pour que la lumière et/ou la bactérie puissent provoquer un mécanisme d'oxydoréduction, mécanisme primaire pour la dégradation de l'ABT. Dans les deux cas, le Fe(III) est réduit en Fe(II) et le ligand est oxydé. Nous avons montré que ce mécanisme a lieu dans le cytoplasme microbien après internalisation du complexe alors qu'il intervient en solution aqueuse photochimiquement. Dans le cas des microorganismes, c'est le

Fe(II) qui doit activer des oxygénases impliquées dans la dégradation de l'ABT et dans le cas de la photochimie des radicaux oxydants (comme le radical hydroxyle) sont à l'origine de cette dégradation. Il est important de noter que pour les deux complexes de fer (NTA et EDDS), qui conduisent à une augmentation importante de la vitesse de dégradation de l'ABT, nous observons les mêmes produits de dégradation de l'ABT et donc les mêmes schémas de bio- ou photodégradation. Ce résultat montre que le fer est au centre des processus de dégradation et que le ligand qui lui est associé est surtout important pour sa stabilisation en solution aqueuse et donc son accessibilité à la lumière ou aux microorganismes. Cet effet très positif de l'ajout de fer dans la solution a également été observé lorsque les microorganismes étaient immobilisés dans les billes d'alginate. *Rhodococcus rhodochrous* est donc également capable d'internaliser le fer même piégé dans une matrice. Enfin au cours de cette étude nous avons mis en évidence un composé d'origine bactérienne qui stabilise le fer sous sa forme réduite. Ceci montre que ces microorganismes peuvent synthétiser des complexants du fer.

La caractéristique majeure de l'environnement est comme nous le savons sa grande variabilité. En effet, suivant les milieux, les paramètres physico-chimiques et chimiques peuvent varier très fortement. De plus un même milieu peut évoluer très rapidement. Le système (espèce ferrique et *Rhodococcus rhodochrous*) sur lequel nous avons travaillé semble bien adapté à cette variabilité environnementale. D'une part, les complexes organiques, FeNTA et FEDDS, sont stables et solubles dans une gamme de pH compatible avec l'environnement et en particulier avec les pH où les bactéries sont actives. D'autre part, la souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 a un métabolisme adapté aux variations environnementales comme les changements d'oxygénation, l'exposition aux UV solaires, le manque éventuel de substrats carbonés ou phosphorés grâce à la présence de réserves endogènes. De plus elle est équipée pour utiliser des sources de fer disponibles et activer son métabolisme, ou encore solubiliser les polluants organiques ; au final elle arrive à optimiser son potentiel dégradatif.

Bien que ce travail ait été réalisé en laboratoire, les données obtenues peuvent être extrapolées à des conditions plus environnementales : les complexes organiques de fer sont présents dans les eaux naturelles comme dans les stations d'épuration ; les souches de *Rhodococcus* sont fréquentes dans tous les milieux naturels (n'oublions pas que la souche *R. rhodochrous* OBT18 a été isolée d'une

station d'épuration), enfin nous savons que les microorganismes sont présents le plus généralement sous forme immobilisée (biofilms, agrégats, flocs).

### Quelques perspectives...

Il apparaît tout d'abord important de compléter l'étude du complexe FeEDDS d'un point de vue physico-chimique et photochimique. En effet, un suivi par dosage colorimétrique du complexant EDDS semble indispensable pour quantifier sa dégradation au cours du processus. La réactivité photochimique du complexe FeEDDS sur le 2-aminobenzothiazole devra également être étudiée pour mieux comprendre les études combinées de photo- et biodégradation. Les résultats montrent qu'en présence de FeEDDS, peu de fer a été utilisé par les bactéries alors que la dégradation d'ABT est fortement accélérée. Il semble donc opportun d'analyser l'effet des concentrations relatives en FeEDDS et en microorganismes.

Les expériences de RMN *in vivo* du phosphore ont révélé la présence d'un pic important qui n'est pas classiquement observé chez les microorganismes. Ce composé original devra être identifié et recherché dans d'autres souches, notamment pour voir s'il est une caractéristique du genre *Rhodococcus*.

En terme de spéciation du fer, il serait très intéressant de regarder l'impact des complexes de Fe(II) sur l'activation des processus de biodégradation. En effet, ces expériences permettraient de valider notre hypothèse d'activation des enzymes qui se base sur la présence de Fe(II) intracellulaire. Un autre aspect concerne l'impact des oxydes de fer qui sont omniprésents dans l'environnement. Nous avons montré que les bactéries n'étaient pas capables d'internaliser le fer sous cette forme. Cependant il est connu qu'en présence de lumière et d'un agent complexant du fer (acides amino- et polycarboxyliques), le fer est solubilisé puis complexé par ces composés. Il serait donc intéressant de mettre au point des expériences de photo- biodégradation faisant intervenir simultanément des oxydes de fer et des agents complexants du fer.

Dans l'environnement, nous savons que le fer est abondant et qu'il peut être présent dans le compartiment aquatique sous forme de complexes. De plus de nombreux microorganismes possèdent des métalloenzymes à base de fer. Un

projet de recherche ambitieux sur la généralisation de cette activation des processus de biodégradation *via* le fer pourrait être envisagé en étudiant d'autres souches bactériennes et d'autres polluants.





## TABLES DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

Figure 1	Squelette benzothiazole .....	10
Figure 2	Exemples d'utilisation des benzothiazoles.....	11
Figure 3	Colorant bleu ( $\lambda = 513$ nm) synthétisé à partir de l'ABT (Podsiadły et al., 2005) .....	12
Figure 4	Mise en évidence de la toxicité aigüe de xénobiotiques (zones obscures) par inhibition de la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> .....	14
Figure 5	Concentration de différents éléments lors de la biodégradation du BTSO <sub>3</sub> par des boues activées (▲) BTSO <sub>3</sub> ; (●) ammonium ; (○) sulfate ; (■) carbone organique .....	17
Figure 6	Dégradation du MBT (A) et du BT (B) par des boues activées (Reemtsma et al., 1995) .....	18
Figure 7	Dégradation du TCMTB par des boues activées (Reemtsma et al., 1995).....	19
Figure 8	Voies métaboliques de dégradation du TCMTB proposées par Reemtsma et al. (1995) .....	19
Figure 9	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (à gauche) – <i>Rhodococcus rhodochrous</i> (à droite) .....	20
Figure 10	Transformation du BT par la souche <i>Rhodococcus erythropolis</i> BTSO <sub>3</sub> 1. (De Wever et al., 1998).....	20
Figure 11	Croissance de la souche <i>Rhodococcus erythropolis</i> BTSO <sub>3</sub> 1 sur un mélange de BT, d'OBT et de BTSO <sub>3</sub> (De Wever et al., 1998) .....	21
Figure 12	Etude par RMN <sup>1</sup> H in situ de la cinétique de dégradation du MBT (Haroune et al., 2004) .....	21
Figure 13	Cinétique de transformation de l'ABT (□) et de formation du 6OH-ABT (○) par <i>Rhodococcus rhodochrous</i> OBT18 (Haroune et al., 2001) .....	22
Figure 14	Mécanisme de photolyse du MBT en milieu organique (Párkányi et Abdelhamid, 1985) .....	24
Figure 15	Schéma de dégradation photochimique du TCMTB (Brownlee et al., 1992).....	25
Figure 16	Dégradation du MBTU – proposition du mécanisme réactionnel mis en jeu .....	26
Figure 17	Structure du complexe FeNTA .....	27
Figure 18	Cinétiques de dégradation de l'ABT.....	27
Figure 19	2-amino-6-hydroxybenzothiazole 6OH-ABT (M1).....	28
Figure 20	Métabolite M2a.....	28
Figure 21	Photoproduit P2 et 2-amino-4-hydroxybenzothiazole 4OH-ABT (P3).....	28
Figure 22	Cinétiques de dégradation de l'ABT ▲ bactéries + FeNTA, sans lumière ; □ bactéries + lumière ; ○ bactéries + FeNTA + lumière .....	29
Figure 23	Voies de dégradation de l'ABT (Bunescu et al., 2008a).....	30
Figure 24	Proposition de mécanismes du FeNTA lors de sa photodégradation et de sa biodégradation par la souche <i>Rhodococcus rhodochrous</i> - les traits pleins sont des	

	mécanismes prouvés par Bunescu et al., 2008b, les traits en pointillés sont des mécanismes proposés dans la littérature (Abida et al., 2006 ; Egli, 2001).....	31
Figure 25	Complexe aqueux de fer : le complexe hexaaquafer(III).....	33
Figure 26	Diagramme potentiel/pH du fer .....	34
Figure 27	Formules des principaux acides aminopolycarboxyliques synthétiques (Egli, 2001).....	35
Figure 28	Formules des principaux acides aminopolycarboxyliques d'origine naturelle (Egli, 2001) .....	36
Figure 29	Structures des complexes Métal-NTA et Métal-EDTA .....	36
Figure 30	Schéma des différentes transformations de fer(III) et fer(II) qui peuvent se produire en solution aqueuse : Fe(II)-L et Fe(III)-L représentent le fer ferreux et ferrique complexés par un ligand L, $\equiv\text{Fe(III)(OH)}$ et $\equiv\text{Fe(III)-L}$ représentent les espèces attachées à la surface d'(oxy)hydroxydes de fer et Fe(II) et Fe(III) représentent les ions ferreux et ferriques aqueux.....	37
Figure 31	Cycle photocatalytique du fer(III) en solution aqueuse .....	39
Figure 32	Cinétiques de photodégradation du 4-CP (0,2 mM) en fonction de différentes concentrations en FeNTA ; pH = 4. (Abida et al., 2006).....	40
Figure 33	Dégradation du 4-CP photoinduite par le complexe FeNTA à $\lambda = 365$ nm .....	41
Figure 34	Hèmes contenant un atome de fer .....	44
Figure 35	Exemples de clusters fer-soufre .....	44
Figure 36	Classification des cytochromes P-450 (Schéma de Steve Chapman, <a href="http://www.chem.ed.ac.uk/chapman">www.chem.ed.ac.uk/chapman</a> ) .....	45
Figure 37	Fonctionnement des cytochromes de la classe IV (Roberts et al., 2002).....	46
Figure 38	Cycle réactionnel du cytochrome P-450 (RH : substrat hydrophobe).....	46
Figure 39	Réaction de dihydroxylation du toluène catalysée par une dioxygénase de type I groupe 1 (adapté de Wackett, 1995) .....	48
Figure 40	Réaction de dihydroxylation des benzoates substitués (Ge et Eltis, 2003) .....	48
Figure 41	Dihydroxylation du phtalate par la phtalate dioxygénase (Gassner et al., 1995) .....	49
Figure 42	Schéma d'action de la 1,2- dioxygénase sur un catéchol (Pascaly et al., 2001) .....	49
Figure 43	Mécanisme de clivage d'un catéchol par la 2,3-dioxygénase et par la 1,2-dioxygénase (Vetting et Ohlendorf, 2000).....	50
Figure 44	Voies de dégradation du 3-hydroxybenzoate par P. acidovorans et P. testosteroni et enzymes mises en jeu (Harpel et Lipscomb, 1990).....	51
Figure 45	Fabrication du vinaigre par immobilisation des bactéries acétiques sur copeaux de bois	52
Figure 46	Classification des techniques d'immobilisation adaptée de Willaert et Baron 1996 .....	54
Figure 47	Immobilisation à la surface d'un support : 3 méthodes (Kourkoutas et al., 2004).....	55
Figure 48	Formation de biofilm ( <a href="http://www.ifremer.fr">www.ifremer.fr</a> ).....	55
Figure 49	Inclusion dans une matrice poreuse (Kourkoutas et al., 2004) .....	56
Figure 50	Cellules immobilisées derrière une barrière (Kourkoutas et al., 2004).....	58
Figure 51	Cellules immobilisées par floculation (Kourkoutas et al., 2004) .....	59

Figure 52	Copolymère d'alginate constitué de 2 unités d'acide guluronique et de 2 unités d'acide mannuronique .....	60
Figure 53	Alginate de sodium .....	61
Figure 54	Coordination d'un cation $\text{Ca}^{2+}$ avec deux unités d'acides guluronique.....	62
Figure 55	Mécanisme de gélification de l'alginate (site <a href="http://www.genialab.de">www.genialab.de</a> ) .....	62
Figure 56	Recyclage des cellules de <i>Rhodococcus opacus</i> TSP203 immobilisées et en suspension pour la dégradation de 100 µg/L de Kaneclor 300. Pourcentage de dégradation du dichlorobiphényle (□), du trichlorobiphényle (▲), du tétrachlorobiphényle (●) et du pentachlorobiphényle (◆) par les cellules immobilisées ; pourcentage de dégradation du dichlorobiphényle (+), du trichlorobiphényle (×), du tétrachlorobiphényle (○) et du pentachlorobiphényle (■) par les cellules libres .....	64
Figure 57	Système utilisé pour faire une étude en RMN $^{13}\text{C}$ de la bactérie <i>Fibrobacter succinogenes</i> (Grivet et Delort, 2008) .....	67
Figure 58	Système mis en place pour une étude RMN en condition aérobie (Grivet et Delort, 2008).....	68
Figure 59	Réacteur cyclone (A) et son insertion dans le spectromètre RMN (B) (Grivet et Delort, 2008).....	68
Figure 60	Systèmes de perfusion utilisés pour l'étude de cellules d' <i>Aspergillus niger</i> encapsulées dans des billes d'alginate (A) et d' <i>Escherichia coli</i> encapsulées dans des billes d'agarose (B) (Grivet et Delort, 2008) .....	69
Figure 61	Formes du phosphate inorganique en fonction du pH.....	71
Figure 62	Variation du déplacement chimique du $\text{P}_i$ en fonction du pH - Expérience réalisée avec <i>Rhodococcus rhodochrous</i> .....	71
Figure 63	Spectre de RMN $^{31}\text{P}$ (800 scans) d' <i>E. coli</i> HB101 sensible à la tellurite – spectre acquis environ 25 minutes après l'ajout de glucose – SP : sucres phosphomonoester, PDE : phosphodiester, UDPG : uridine diphosphoglucose, ATP : adénosine triphosphate, $\text{P}_i$ : phosphate inorganique, NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Lohmeier-Vogel et al., 2004) .....	74
Figure 64	Evolution du déplacement chimique du signal du $\text{P}_i$ avec le temps chez <i>Escherichia coli</i> , souche sensible. Cercles pleins, témoin ; cercles ouverts, cellules en présence de tellurite ; carrés ouverts, cellules en présence de sélénite. (Lohmeier-Vogel et al., 2004) .....	74
Figure 65	Evolution des aires d'intégration des signaux du $\beta\text{-ATP}$ avec le temps chez <i>Escherichia coli</i> , souche sensible. ● : témoin ; ○ : cellules en présence de tellurite ; □ : cellules en présence de sélénite. (Lohmeier-Vogel et al., 2004).....	75
Figure 66	Région des phosphates inorganiques - témoin (A); cellules en présence de tellurite (B); cellules en présence de sélénite (C) - (Lohmeier-Vogel et al., 2004) .....	75
Figure 67	Spectres de RMN du $^{31}\text{P}$ d' <i>Aspergillus niger</i> après 42 heures de culture et perfusés avec un tampon à pH = 6,7, saturé en oxygène et contenant 25 mM de glucose. Les spectres ont été acquis après une perfusion de 15 min (A1), de 30 min (A2), de 45 min (A3) et de 60 min (A4). (Hesse et al., 2000).....	77
Figure 68	Spectres réalisés in vivo et mettant en évidence l'utilisation du $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{glucose}$ par des cellules en repos de <i>F. succinogenes</i> S85 (Matheron et al., 1997).....	79

Figure 69	Voies de synthèse du succinate et de l'acétate chez <i>Fibrobacter succinogenes</i> après métabolisation de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. (Matheron et al., 1997).....	81
Figure 70	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> sur milieu TS .....	84
Figure 71	(en haut) Système mis en place pour la formation des billes d'alginate : à gauche, la solution contenant l'alginate dissous et les bactéries ; au centre dans le fond, la pompe péristaltique ; en premier plan à droite le flacon contenant une solution de $\text{CaCl}_2$ à 0,2 M – (en bas) bille d'alginate contenant les bactéries.....	85
Figure 72	Spectre UV du complexe Fe-NTA (concentration : 0,1 mM).....	86
Figure 73	Spectres UV de l'EDDS (1 mM) et du FeEDDS (0,3 mM).....	87
Figure 74	Complexe Fe-citrate.....	87
Figure 75	Photo-bioréacteur.....	89
Figure 76	Principe du traitement SPE .....	92
Figure 77	Structure de la phase de la cartouche Oasis <sup>®</sup> HLB .....	93
Figure 78	Protocole d'utilisation de la cartouche SPE Oasis <sup>®</sup> HLB .....	94
Figure 79	Plateforme robotisée TECAN <sup>®</sup> avec le module SPE .....	94
Figure 80	Structure de la ferrocine.....	95
Figure 81	Spectre UV du complexe fer-ferrocine ( $420 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$ ).....	96
Figure 82	Plaque 96 puits : dosage du fer total dans une série d'échantillons .....	97
Figure 83	Complexe fer (II)- 1,10-phénanthroline.....	97
Figure 84	Spectre UV du complexe fer-phénanthroline ( $350 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$ ).....	97
Figure 85	Plaque 96 puits : dosage du fer II.....	98
Figure 86	Schéma du système de perfusion mis en place pour réaliser la RMN $^{31}\text{P}$ in vivo (avec système d'éclairage pour les expériences réalisées au CEA de Grenoble- sans éclairage pour celles réalisées au SEESIB à Clermont-Ferrand) .....	100
Figure 87	(a) Tube contenant les cellules encapsulées muni d'un système d'éclairage par le haut et doté au centre d'un tube en quartz strié réfléchissant la lumière (b) Mise en place du tube à l'intérieur du spectromètre .....	101
Figure 88	Acide méthylène diphosphonique.....	102
Figure 89	Courbe de calibration du TC.....	104
Figure 90	Courbe de calibration de l'IC.....	105
Figure 91	Principe de fonctionnement d'une cellule NDI .....	105
Figure 92	Spectres de RMN du $^{31}\text{P}$ acquis in vivo (A) cellules libres – (B) cellules immobilisées – X est un métabolite non identifié.....	109
Figure 93	Spectres de RMN $^1\text{H}$ montrant l'évolution de la dégradation de l'alginate par <i>R. rhodochrous</i> sur une période de 9 jours (X est un artefact) .....	110
Figure 94	Chromatogramme d'une solution mère d'ABT à 0,5 mM avant SPE.....	111
Figure 95	Chromatogramme après dépôt de 1 ml d'une solution d'ABT à 0,5 mM.....	112
Figure 96	Chromatogramme après élution avec 1 ml d'acétonitrile et dilution x4 .....	112

Figure 97	Chromatogramme d'une solution mère de 6OHABT à 0,5 mM.....	113
Figure 98	Chromatogramme après dépôt de 1 ml d'une solution de 6OH-ABT à 0,5 mM .....	113
Figure 99	Chromatogramme après élution avec 1 ml d'acétonitrile et dilution x 4 .....	113
Figure 100	Elimination de l'alginate sur cartouche SPE OASIS® HLB - (A) les différentes étapes de l'extraction (B) spectres RMN acquis après chacune des étapes .....	114
Figure 101	<i>Evolution de la concentration en 6OHABT avec le temps lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées – hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres – hv .....</i>	<i>118</i>
Figure 102	Evolution de la concentration en 6OHABT avec le temps lors de la photodégradation de l'ABT (0,5 mM). (△) billes d'alginate + hv ; (▲) billes d'alginate – hv ; (□) solution + hv ; (■) solution – hv.....	119
Figure 103	<i>Evolution de la concentration en 4OHABT avec le temps lors de la photodégradation de l'ABT (0,5 mM). (△) billes d'alginate + hv ; (▲) billes d'alginate – hv ; (□) solution + hv ; (■) solution – hv .....</i>	<i>120</i>
Figure 104	Evolution de la concentration en fer total avec le temps lors de la photodégradation de l'ABT (0,5 mM). (△) billes d'alginate + hv ; (▲) billes d'alginate – hv ; (□) solution + hv ; (■) solution – hv.....	120
Figure 105	Evolution de la concentration en ABT avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées – hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres – hv.....	121
Figure 106	Evolution de la concentration en 6OHABT avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées – hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres – hv ...	122
Figure 107	Evolution de la concentration en 4OHABT avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées – hv ; (□) cellules libres + hv ; (■) cellules libres – hv ...	123
Figure 108	Evolution de la concentration en fer total avec le temps lors de la photobiodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM). (△) cellules immobilisées + hv ; (▲) cellules immobilisées – hv ; (□) cellules libres+ hv ; (■) cellules libres – hv ....	123
Figure 109	Evolution de la concentration en carbone total lors des incubations (◆) avec cellules seules, (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1mM).....	125
Figure 110	Evolution de la concentration en carbone inorganique lors des expériences (◆) avec cellules seules, (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM).....	125
Figure 111	<i>Evolution de la concentration en carbone organique total lors des expériences (◆) avec cellules seules, (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM) .....</i>	<i>126</i>

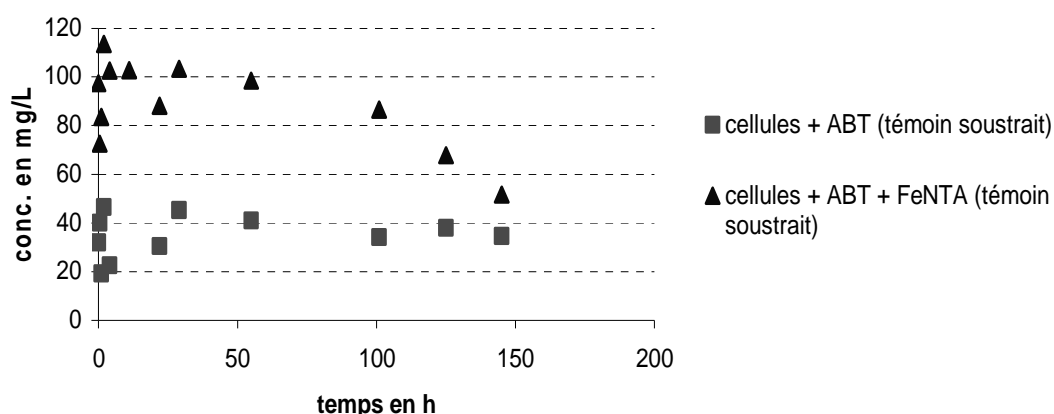


Figure 112 Evolution de la concentration en carbone organique total prenant en compte le témoin cellules lors des expériences (■) avec cellules + ABT (0,5 mM) et (▲) avec cellules + ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM)..... 126

- Figure 113 Spectres de RMN  $^1\text{H}$  illustrant l'évolution en fonction du temps des métabolites du FeNTA lors de l'incubation des bactéries avec l'ABT (0,5 mM) et le complexe FeNTA (1 mM)..... 128
- Figure 114 a. Cinétiques de dégradation de l'ABT sur 3 cycles de 72 heures. (×) ABT + FeNTA + cellules en suspension ; (◆) ABT + FeNTA + cellules immobilisées ; (■) ABT + FeNTA + billes ..... 130
- Figure 115 Concentrations en 6OHABT au cours de 3 cycles de 72 heures. (×) ABT + FeNTA + cellules en suspension ; (◆) ABT + FeNTA + cellules immobilisées..... 131
- Figure 116 Concentrations en 4OHABT au cours de 3 cycles de 72 heures. (×) ABT + FeNTA + cellules en suspension ; (◆) ABT + FeNTA + cellules immobilisées..... 132
- Figure 117 Spectres de RMN  $^{31}\text{P}$  non découplés  $^1\text{H}$  (a) du composé non identifié X, (b) de l'AMPc, (c) du GMPc ..... 136
- Figure 118 Spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  acquis in vivo sur *R. rhodochrous* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium et soumises à diverses conditions..... 137
- Figure 119 Evolutions de différents marqueurs de l'énergétique cellulaire de *R. rhodochrous* lorsqu'elle est soumise à différentes conditions. (a) évolution du déplacement chimique du  $\text{P}_i$  ; (b) évolution des valeurs des intégrales du  $\beta\text{-ATP}$  ; (c) évolution des valeurs des intégrales des polyphosphates..... 139
- Figure 120 Schéma du principe de la chaîne respiratoire..... 140
- Figure 121 Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  in vivo de bactéries *R. rhodochrous* incubées avec du glucose [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] ..... 141
- Figure 122 Spectres de RMN 2D HSQC  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  (A) des extraits cellulaires de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 obtenus après incubation avec du glucose marqué [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] pendant 118 h ; (B) du tréhalose commercial pur ; (C), spectre de RMN 1D  $^{13}\text{C}$  des extraits perchloriques de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 avant l'addition de glucose [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ], les signaux du tréhalose pur sont présentés en insert..... 142
- Figure 123 Evolution avec le temps des valeurs des intégrales du  $\text{C1}\alpha$  (■) et du  $\text{C1}\beta$  (□) du glucose, du  $\text{C1}$  (▲) et du  $\text{C6}$  du trehalose (△)..... 143

Figure 124	Voies de synthèse du tréhalose lorsque <i>Rhodococcus rhodochrous</i> OBT18 est incubée en présence de glucose marqué [ $1-^{13}\text{C}$ ] (✱) par synthèse directe (✴) après réversion.	144
Figure 125	Photographies prises après les tests d'émulsion (a) avec les milieux de culture, (b) avec les bactéries. P : Pa : paraffine ; Hd : hexadécane ; h : hexane ; X : xylène ; Pe : pentane .....	145
Figure 126	Comportement métabolique de <i>R. rhodochrous</i> OBT18 dans différentes conditions de biodégradation, en absence de lumière – valeurs provenant des spectres de RMN in vivo - (a) évolution du déplacement chimique du Pi ; (b) évolution du taux de $\beta$ -ATP ; (c) évolution du taux de polyphosphates ; (d) évolution de la concentration en ABT .....	148
Figure 127	Comportement métabolique de <i>R. rhodochrous</i> OBT18 lors des procédés de photo-biodégradation en présence ou non de lumière – conditions : ABT (0,5 mM) + FeNTA (1 mM) - valeurs provenant des spectres de RMN in vivo. (a) évolution du déplacement chimique du Pi ; (b) évolution du taux de $\beta$ -ATP ; (c) évolution du taux de polyphosphates .....	150
Figure 128	Internalisation du complexe FeNTA par <i>R. rhodochrous</i> (adapté de Bunesco, 2006) ..	153
Figure 129	Structure du complexe FeNTA .....	154
Figure 130	Dégradation de l'ABT (0,5 mM) par <i>R. rhodochrous</i> en présence du complexe FeNTA (1 mM) .....	154
Figure 131	Evolutions de la concentration en 6OHABT (a) et en 4OHABT (b) dans les expériences de biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence ou non de FeNTA (1 mM) .....	155
Figure 132	Evolutions de la concentration en fer total et en Fe(II) lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeNTA (1 mM) .....	156
Figure 133	<i>Concentrations en Fe(II) lors de la dégradation d'ABT (0,5 mM) avec ou sans lumière, en présence de FeNTA seul (1 mM) et en présence de FeNTA (1mM) et de bactéries .</i>	158
Figure 134	<i>Evolution de la concentration en fer(II) en présence et en absence d'IDA, sous irradiation. [IDA] = 0,3 mM; [fer(II)] = 0,3 mM ; pH = 6,0 ; T = 25 °C (Abida, 2005)</i> .....	159
Figure 135	Spectres RMN $^1\text{H}$ montrant les évolutions des métabolites du FeNTA lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) avec le complexe FeNTA (1 mM), sans lumière .	160
Figure 136	Evolutions des concentrations en NTA après décomplexation, IDA, glycine et de l'intégrale relative de Y d'après l'intégration de spectres RMN $^1\text{H}$ au cours de l'incubation de <i>R. rhodochrous</i> et de l'ABT (0,5 mM) avec le complexe FeNTA (1 mM) en absence de lumière .....	161
Figure 137	Structure chimique du [S,S]EDDS .....	162
Figure 138	Dégradation de l'ABT (0,5 mM) par <i>R. rhodochrous</i> en présence ou en absence du complexe FeEDDS (1mM), avec ou sans lumière .....	162
Figure 139	<i>Evolution des concentrations en métabolites 6OHABT (a) et 4OHABT (b) lors de la dégradation de l'ABT (0,5 mM) par R. rhodochrous en présence ou en absence du complexe FeEDDS (1 mM), avec ou sans lumière.....</i>	163
Figure 140	Evolutions de la concentration en fer total (a) et en Fe(II) (b) lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence de FeEDDS (1 mM) avec et sans lumière.....	164
Figure 141	Spectre RMN $^1\text{H}$ de l'EDDS (1 mM) .....	166
Figure 142	Evolution de la concentration en EDDS (1 mM) au cours du temps lors des expériences cellules + EDDS avec ou sans lumière .....	166



Figure 143	Spectres UV de l'EDDS (1 mM) et du FeEDDS (0,3 mM).....	167
Figure 144	Spectres RMN $^1\text{H}$ montrant le devenir du FeEDDS (1 mM) sous irradiation .....	168
Figure 145	Evolution des intégrales des photoproduits issus du complexe FeEDDS (1 mM).....	169
Figure 146	Spectres RMN $^1\text{H}$ montrant l'évolution du FeEDDS (1 mM) lors de la biodégradation de l'ABT à l'obscurité .....	169
Figure 147	Spectre RMN $^1\text{H}$ montrant le devenir du FeEDDS (1 mM) lors de son incubation en présence de bactéries, d'ABT et de lumière .....	170
Figure 148	Evolution des concentrations des produits de dégradation issus du complexe FeEDDS (1 mM) lors de son incubation en présence de lumière et d'ABT (0,5 mM).....	171
Figure 149	Structure du citrate .....	172
Figure 150	Evolutions des concentrations en ABT (a), en 6OHABT (b) et en 4OHABT (c) lors de la biodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence du complexe Fe-citrate (1 mM) avec ou sans lumière .....	173
Figure 151	Evolutions des concentrations en fer total (a) et en Fe(II)(b) lors de la biodégradation d'ABT (0,5 mM) en présence du complexe Fe-citrate (1 mM), avec ou sans lumière .	174
Figure 152	Suivi par RMN $^1\text{H}$ de la dégradation du citrate (C = 1 mM) par R. rhodochrous en présence (a) et en absence (b) de lumière .....	175
Figure 153	Suivi par RMN $^1\text{H}$ de la dégradation du complexe Fe-citrate (1mM) par R. rhodochrous en présence (a) et en absence (b) de lumière.....	176
Figure 154	Cinétiques de biodégradation de l'ABT (0,5 mM) avec ou sans lumière et en présence ou non des différents complexes de fer (1 mM) FeNTA ; Fe-citrate et FeEDDS.....	177
Figure 155	Dégradation de l'ABT (0,5 mM) par R. rhodochrous avec ou sans lumière et en présence ou non de goethite (éq. 1 mM en fer), de magnétite (éq. 1 mM en fer) et de $\text{FeCl}_3$ (1 mM) .....	179
Figure 156	Evolutions des concentrations en 6OHABT (a) et en 4OHABT (b) lors de la biodégradation d'ABT en présence ou non de goethite (éq. 1 mM en fer), de magnétite (éq. 1 mM en fer) et de $\text{FeCl}_3$ (1 mM), avec et sans lumière .....	181
Figure 157	Evolutions des concentrations en fer total (a) et en Fe(II)(b) lors de la biodégradation d'ABT (0,5 mM) en présence de goethite (éq. 1 mM en fer), de magnétite (éq. 1 mM en fer) et de $\text{FeCl}_3$ (1 mM), avec ou sans lumière .....	182
Figure 158	Schéma montrant l'utilisation et le devenir du fer (L : ligand présent dans le milieu aqueux ; Ldeg : ligand issu de la dégradation photochimique ou microbiologique de L ; Lcell : ligand produit par la cellule).....	186

## TABLEAUX

Tableau 1	Nom des benzothiazoles en fonction de la nature du substituant R .....	10
Tableau 2	Données sur l'ABT (d'après le site <a href="http://www.acros.com">www.acros.com</a> ) .....	12
Tableau 3	Propriétés générales des benzothiazoles (Kirouani-Hanari, 2003) .....	13
Tableau 4	Résultats du test Microtox <sup>®</sup> pour différents benzothiazoles ; temps d'exposition au toxique : 30 minutes (Malouki, 2004).....	14
Tableau 5	Concentrations moyennes de divers benzothiazoles présents dans l'eau à traiter de la station d'épuration de Berlin-Ruhleben (Kloepfer et al., 2004).....	15
Tableau 6	Concentration en benzothiazoles dans différents compartiments .....	16
Tableau 7	Souches microbiennes et benzothiazoles sur lesquelles elles sont actives .....	22
Tableau 8	Composition en fer (III) de l'eau du Rhin (Eberle et Palmer, 1986).....	34
Tableau 9	Exemples de protéines liées au fer et leurs fonctions biologiques.....	42
Tableau 10	Avantages et inconvénients des techniques d'immobilisation des cellules (Junter et Jouenne, 2004).....	53
Tableau 11	Déplacements chimiques de métabolites phosphorylés détectables par RMN du <sup>31</sup> P – valeurs données pour un pH neutre (Fan, 1996) .....	70
Tableau 12	Evolution des concentrations en ABT et en fer au cours du temps dans le milieu d'incubation contenant les billes d'alginate ou les cellules en suspension, de l'ABT (0,5 mM) et du FeNTA (1 mM) .....	116
Tableau 13	Pourcentages de dégradation de l'ABT lors du procédé de biodégradation de l'ABT (0,5 mM) avec ou sans lumière (analyses HPLC) par des cellules en suspension et des cellules immobilisées – NB : les valeurs entre parenthèses sont corrigées et prennent en compte l'adsorption sur l'alginate .....	117
Tableau 14	Pourcentages de dégradation de l'ABT lors du procédé de photodégradation de l'ABT (0,5 mM) en présence ou non de billes d'alginate (sans bactérie) (analyses HPLC)– NB : les valeurs entre parenthèses sont corrigées et prennent en compte l'adsorption sur l'alginate .....	118
Tableau 15	Concentrations mesurées par RMN <sup>1</sup> H et par HPLC, valeurs des TOC des expériences (A) en présence d'ABT (0,5 mM), (B) en présence d'ABT (0,5 mM) et de FeNTA (1 mM) .....	127
Tableau 16	Biodégradations de l'ABT (0,5 mM) par <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en présence de FeNTA (1 mM) : variations de la concentration en fer total et en Fe(II) au cours du temps.....	157
Tableau 17	Concentrations en IDA et en Fe(II) lors des processus de photodégradation et de biodégradation du FeNTA (1 mM) .....	160
Tableau 18	Evolution de la concentration en EDDS au cours du temps lors de la photodégradation d'EDDS (1 mM) .....	167
Tableau 19	Pourcentages de dégradation de l'ABT (0,5 mM) par <i>R. rhodochrous</i> avec ou sans lumière et en présence ou non de FeNTA (1 mM), de Fe-citrate (1 mM) ou de FeEDDS (1 mM).....	178

Tableau 20	Pourcentages de biodégradation de l'ABT après 145 heures d'incubation en présence ou non d'oxydes et d'oxy(hydr)oxydes de fer, avec ou sans lumière .....	180
------------	---	-----

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abida O., Mailhot G., Litter M., Bolte M.,** Impact of iron-complex (Fe(III)-NTA) on photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution. Photochem. Photobiol. Sci., 2006, 5, 395-402.

**Abida O.,** Impact des complexes de fer et de la lumière solaire sur le devenir de polluants de l'environnement aquatique, Thèse de l'Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand), 2005, N°d'ordre : D.U. 1635

**Abou Seoud M., Maachi R.,** Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas* sp. Z. Naturforsch., 2003, 58c, 726-731.

**Andreozzi R., Marotta R.,** Removal of benzoic acid in aqueous solution by Fe(III) homogeneous photocatalysis. Wat. Res., 2004, 38, 1225-1236.

**Anjou K., Von Sydow E.,** The aroma of cranberries. 1I. Vaccinium macrocarpon Ait. Acta Chem. Scand., 1967, 21, 2076-2082.

**Aubert S., Gout E., Bligny R., Marty-Mazars D., Barrieu F., Alabouvette J., Marty F., Douce R.,** Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cell subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. J. Cell. Biol., 1996, 133, 1251-1263.

**Bajt O., Mailhot G., Bolte M.,** Degradation of dibutyl phthalate by homogeneous photocatalysis with Fe(III) in aqueous solution. Appl. Cat. B Environ., 2001, 33, 239-248.

**Balmer M.E., Sulzberger B.,** Atrazine degradation in irradiated iron/oxalate systems: effects of pH and oxalate. Environ. Sci. Technol., 1999, 33, 2418-2424.

**Barbotin J.N., Portais J.C.,** NMR in Microbiology: theory and applications. Horizon Scientific, Norwich, 2000.

**Barton J.K., Den Hollander J.A., Hopfield J.J., Shulman R.G.,**  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance of trehalose mobilization in yeast spores. J. Bacteriol., 1982, 151, 177-185.

**Bergmaier D., Champagne C.P., Lacroix C.,** Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. J. Appl. Microb., 2003, 95, 1049-1057.

**Bertini I., Cremonini M.A., Ferreti S., Lozzi I., Luchinat C., Viezzoli M.S.,** Arene Hydroxylases : metalloenzymes catalysing dioxygenation of aromatic compounds. Coord. Chem. Rev., 1996, 151, 145-160.

**Besse P., Combourieu B., Boyse G., Sancelme M., De Wever H., Delort A.M.,** Long range  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear shift correlation at natural abundance: a tool to study benzothiazole biodegradation by two *Rhodococcus* strains. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67, 1412-1417.

**Boswell C.D., Dick R.E., Macaskie L.E.,** The effect of heavy metals and other environmental conditions on the aerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. Microbiol., 1999, 145, 1711-1720.

**Bradshaw T.D., Stone E.L., Trapani V., Leong C.O., Matthews C.S., Poele R., Stevens M.F.,** Mechanisms of acquired resistance to 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazole in breast cancer cell lines. Breast Cancer Res. Treat., 2008, 110, 57-68.

**Brownlee B.G., Carey J.H., Mac-Innis G.A., Pellizzari I.T.,** Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles. Environ. Toxicol. Chem., 1992, 11, 1153-1168.

**Bryson H., Fulton B., Benfield P.,** Riluzole : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. Drugs, 1996, 52, 549-563.

**Bunescu A.,** Photo- et bio-dégradation de dérivés du benzothiazole: étude en système combiné, Thèse de l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), 2006, N°d'ordre : D.U. 1725

**Bunescu A., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Mailhot G., Delort A.M.,** Comparison of microbial and photochemical process and their combination for degradation of 2-aminobenzothiazole. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008a, 74, 2976-2984.

**Bunescu A., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Mailhot G., Delort A.M.,** Fate of the nitrilotriacetic acid-Fe(III) complex (FeNTA) during photodegradation and biodegradation by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008b, 74, 6320-6326.

**Campbell-Burk, S.L., den Hollander J.A., Alger J.R., Shulman R.G.,**  $^{31}\text{P}$  NMR saturation-transfer and  $^{13}\text{C}$  NMR kinetic studies of glycolytic regulation during anaerobic and aerobic glycolysis. *Biochemistry*, 1987, 26, 7493-7500.

**Catastini C., Sarakha M., Mailhot G., Bolte M.,** Iron (III) aquacomplexes as effective photocatalysts for the degradation of pesticides in homogeneous aqueous solutions. *Sci. Total Environ.*, 2002, 298, 219-228.

**Cemagref,** Les bioréacteurs à membrane pour le traitement des effluents domestiques, 2004.

**Chipinda I., Zhang X.-D., Simoyi R.H., Siegel P.D.,** Mercaptobenzothiazole allergenicity role of the thiol group. *Cutan. Ocular Toxicol.*, 2008, 27, 103-116.

**Chudoba J.F.T., Zeis K.,** Biochemischer abbau von benzothiazolderivaten. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1977, 5, 495-498.

**Dahan-Grobgelg, Livneh Z., Maretzek A.F., Polak-Charcon S., Eichenbaum Z., Degani H.,** Reversible induction of ATP synthesis by DNA damage and repair in *Escherichia coli*. *In vivo* NMR studies. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 30232-30238.

**De Graaf A.A., Wittig K., Laufer B., Schmitz G., Wiechert W., Sahm H.,** Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose- and xylose-fed continuous cultures as analysed by  $^{13}\text{C}$ - and  $^{31}\text{P}$ - NMR spectroscopy. *Arch. Microbiol.*, 1999, 171, 371-385.

**De Wever H., De Cort S., Noots I., Verachtert H.,** Isolation and characterization of *Rhodococcus rhodochrous* for the degradation of the wastewater component 2-hydroxybenzothiazole. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, 47, 458-461.

**De Wever H., Vereecken K., Stolz A., Verachtert H.,** Initial transformations in the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64, 3270-3274.

**Deborde C., Corre C., Rolin D.B., Nadal L., de Certaines J.D., Boyaval P.,** Trehalose biosynthesis in dairy *Propionibacterium*. J. Magn. Reson. Anal., 1996, 297-304.

**Delort A.-M., Dauphin G., Guyot J., Jeminet G.,** Study by NMR of the mode of action of monensin on *Streptococcus faecalis* de-energized and energized cells. Biochim. Biophys. Acta., 1989, 1013, 11-20.

**Drechsel H., Metzger J., Freund S., Jung G., Boelaert J.R., Winkelmann G.,** Rhizoferrin- a novel siderophore from the fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. Bio. Metals, 1991, 4, 238-243.

**Drotar A.M., Burton G.A., Tavernier J.E., Fall R.,** Widespread occurrence of bacterial thiol methyltransferases and the biogenic emission of methylated sulfur gases. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53, 1626-1631.

**Eberle S.H., Palmer W.Z.,** Über die partikelgrößenverteilung und die löslichkeit des eisens(III) im rheinwasser. Z. Wasser Abwasser Forsch, 1986, 19, 213-218.

**Egli T.,** Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. J. Biosc. Bioeng., 2001, 92, 89-97.

**Fan T.W.M.,** Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 1996, 28, 161-219.

**Fife T.H., Hutchins J.E. C., Wangla M.S.,** Highly efficient intramolecular nucleophilic reactions. The cyclization of p-nitrophenyl *N*-(2-Mercaptophenyl)-*N*-methylcarbamate and phenyl *N*-(2-Aminophenyl)-*N*-methylcarbamate. J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 5878-5882.

**Florentz M., Granger P., Hartemann P.,** Use of  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy to study phosphorus metabolism in microorganisms from wastewaters. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 519-525.

**Forano E., Delort A.M., Matulova M.,** Carbohydrate metabolism in *Fibrobacter succinogenes*: what NMR tells us. Microb. Ecol. Health Dis., 2008, 1-9.

**Gaja M.A., Knapp J.S.,** The microbial degradation of benzothiazoles. J. Appl. Microbiol., 1997, 83, 327-334.

**Gassner G., Ludwig M., Gati D.L., Correll C.C., Ballou D.P.,** Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase. FASEB, 1995, 9, 1411-1419.

**Ge Y., Eltis L.D.,** Characterization of hybrid toluate and benzoate dioxygenases. J. Bact., 2003, 185, 5333-5341.

**Goettfert J., Parlar H., Korte F.,** Microbial transformation of [ $^{14}\text{C}$ ]methabenzthiazuron by the soil fungus *Hypocrea* Cf. *pilulifera* St. Con : isolation, identification and characterization of some metabolites from the chloroform extract. J. Agric. Food Chem., 1978, 26, 628-632.

**Gold L.S., Slone T.H., Stern B.R., Bernstein L.,** Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals. Mutat. Res., 1993, 286, 75-100.

**Gonzalez B., de Graaf A., Renaud M., Sahm H.,** Dynamic *in vivo*  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostat culture during the aerobic - anaerobic shift. Yeast, 2000, 16, 483-497.

**Grivet J.P., Delort A.M., Portais J.C.,** NMR and microbiology : from physiology to metabolomics. Biochimie, 2003, 85, 823-840.

**Grivet, J.P., Delort A.M.,** 2008. NMR for microbiology: *in vivo* and *in situ* applications. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. doi: 10.1016/j.pnmrs.2008.02.001.



**Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D., Neufeld R.J.**, Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotech.*, 1994, 14, 75-107.

**Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Delort A. M.**,  $^1\text{H}$  NMR : a tool to study the fate of pollutants in the environment. *C. R. A. S. Paris / chemistry n° spécial GERM RMN*, 2001, 4, 759-763.

**Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Reemtsma T., Kloepfer A., Diab A., Knapp J.S., Baumberg S., Delort A.M.**, Benzothiazole degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* strain PA : evidence of a catechol 1,2-dioxygenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 6114-6120.

**Haroune N.**, Métabolisme de benzothiazoles par des souches de *Rhodococcus* : étude par RMN *in situ*. Thèse de l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), 2003 N°d'ordre : D.U. 1458.

**Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Kloepfer A., De Wever H., Delort A.M.**, Metabolism of 2-mercaptobenzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 6315-6319.

**Harpel M.R., Lipscomb J.D.**, Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.*, 1990, 266, 6301-6311.

**Hartbrich A., Schmitz G., Weuster-Botz D., de Graaf A.A., Wandrey C.**, Development and application of a membrane cyclone reactor for *in vivo* NMR spectroscopy with high microbial cell densities. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 51, 624-635.

**Hayaishi O., Katagiri M., Rothberg S.**, Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 5450-5451.

**Hesse S.J.A., Ruijter G.J.G., Dijkema C., Visser J.**, Measurement of intracellular (compartmental) pH by  $^{31}\text{P}$  NMR in *Aspergillus niger*. *J. Biotech.*, 2000, 77, 5-15.

**Iyer A., Kalpana M., Jha B.**, Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enz. Microbiol. Technol.*, 2006, 38, 200-222.

**Jones J.G., Bellion E.,** Methylamine metabolism in *Hanselula polymorpha*: an *in vivo*  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study. J. Bacteriol., 1991, 173, 4959-4969.

**Jung J.H., McLaughlin J.L., Stannard J., Guin J.D.,** Isolation, via activity-directed fractionation, of mercaptobenzothiazole and dibenzothiazyl disulfide as 2 allergens responsible for tennis shoe dermatitis. Cont. Dermat., 1988, 19, 254-259.

**Junter, G.A., Jouenne, T.,** Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... Or the cart before the horse. Biotechnol. Adv., 2004, 22, 633-658.

**Kawaguchi, H., Inagaki A.,** Kinetics of ferric ion promoted photodecomposition of 2-chlorophenol. Chemosphere, 1994, 28, 57-62.

**Kirouani-Hanari, H.,** Microbial and photolytic degradation of benzothiazoles in water and wastewater. Thèse de l'Université de Berlin, 2003.

**Kitamikado M., Tseng C.-H., Yamaguchi K., Nakamura T.,** Two types of alginate lyases. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58, 2474-2478.

**Kjeldstad B., Johnsson A.,**  $^{31}\text{P}$ -NMR study of *Propionibacterium acnes*, including effects caused by near-ultraviolet irradiation. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 927, 184-189.

**Kjeldstad B., Johnsson A., Furuheim K.M., Bergan A.S., Krane J.,** Hyperthermia induced polyphosphate changes in *Propionibacterium acnes* as studied by  $^{31}\text{P}$  NMR. Z. Naturforsch C, 1989, 44, 45-48.

**Kjeldstad B., Heldal M., Nissen H., Bergan A.S., Evjen K.,** Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium acnes* after near-ultraviolet irradiation. Can. J. Microbiol., 1991, 37, 562-567.

**Kloepfer A., Gnirss R., Jekel M., Reemtsma T.,** Occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate in biological treatment. Wat. Sci. Technol., 2004, 50, 203-208.

**Kloepfer A., Jekel M., Reemtsma T.,** Occurrence sources and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 3792-3798.

**Kot-Wasik A., Damrowska D., Namiesnik J.,** Photodegradation and biodegradation study of benzo(a)pyrene in different liquid media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2004, 168, 109-115.

**Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A.A.,** Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.*, 2004, 21, 377-397.

**Lang S., Philp. J.C.,** Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 74, 59-70.

**Lebeau T., Jouenne T., Junter G.-A.,** Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. *Enz. Microb. Technol.*, 1998, 22, 434-438.

**Lemos P.C., Serafim L.S., Santos H., Reis M.A.,** Production of polyhydroxyalkanoates by a mixed culture in a sequencing batch reactor: the use of propionate as carbon source. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 2003, 68, 109-114.

**Lemos P.C., Serafim L.S., Santos H., Reis M.A.,** Metabolic pathway for propionate utilization by phosphorous-accumulating organisms in activated sludge:  $^{13}\text{C}$  labelling and *in vivo* nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 241-251.

**Lemos, P.C., Dai Y., Yuan Z., Santos H., Reis M.A.,** Elucidation of metabolic pathways in glycogen-accumulating organisms with *in vivo*  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *Environ. Microbiol.*, 2007, 9, 2694-2706.

**Lohmeier-Vogel E.M., McInyre D.D., Vogel H.J.,** Phosphorus-31 and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of glucose and xylose metabolism in cell suspensions and agarose-immobilized cultures of *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 61, 2832-2838.

**Lohmeier-Vogel E.M., Leug K.T., Lee H., Trevors J.T., Vogel H.J.**, Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of the effect of pentachlorophenol (PCP) on the physiologies of PCP-degrading microorganisms, *Appl. Environ Microbiol.*, 2001, 67, 3549-3556.

**Lohmeier-Vogel E.M., Ung, S., Turner, R.J.**, *In vivo*  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance investigation of tellurite toxicity in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 7342-7347.

**Lundberg P., Lundquist P.O.**, Primary metabolism in  $\text{N}_2$ -fixing *Alnus incana*-*Frankia* symbiotic root nodules studies by  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic spectroscopy. *Planta*, 2004, 660-672.

**Mainprize J., Knapp J.S., Cally A.G.**, The fate of benzothiazole-2-sulphonic acid in biologically treated industrial effluents. *J. Appl. Bact.*, 1976, 40, 285-291.

**Malouki M., Giry G., Besse P., Combourieu B., Sancelme M., Bonnemoy F., Richard C., Delort A.M.**, Sequential bio- and phototransformation of the herbicide methabenzthiazuron in water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, 22, 2013-2019.

**Malouki M.**, Photo et/ou biotransformation de l'ioxynil et des dérivés benzothiazoliques. Thèse de l'Université Menouri de Constantine (République Algérienne Démocratique et Populaire), 2004.

**Manohar S., Karegoudar T.B.**, Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas sp.* strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49, 785-792.

**Mason H.S., Fowlks W.K., Peterson E.**, Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 2914 – 2915.

**Matheron C., Delort A.M., Gaudet G., Forano E.**, Re-investigation of glucose metabolism in *Fibrobacter succinogenes* using NMR and enzymatic assays. Evidence of pentose phosphate phosphoketolase and pyruvate formate lyase activity, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 1335, 50-60.

**Matsui T., Tanaka Y., Marubashi K.,** Benzothiazole-degrading *Pseudomonas* for bioremediation. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 2004, 12 pp.

**Matulova M., Delort A.M., Nouaille R., Gaudet G., Forano E.,** Concurrent maltodextrin and cellodextrin synthesis by *Fibrobacter succinogenes* S85 as identified by 2D NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem., 2001, 268, 3907-3915.

**Mazellier P., Mailhot G., Bolte M.,** Photochemical behaviour of the Iron(III)/2,6-dimethylphenol system. New J. Chem., 1997a, 21, 389-397.

**Mazellier P., Jirkovsky, P., Bolte M.,** Photodegradation of diuron induced by iron(III) in aqueous solution. Pestic. Sci., 1997b, 49, 259-267.

**Mazellier P., Sarakaha M., Bolte M.,** Primary mechanism for the iron(III) photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution. New J. Chem., 1999, 23, 133-137.

**Mazellier P., Bolte M.,** 3-Chlorophenol elimination upon excitation of dilute iron(III) solution: evidence for the only involvement of  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ . Chemosphere, 2001, 42, 361-366.

**Meiwes J., Fiedler H.P., Haag H., Zähler H., Konetschny-Rapp S., Jung G.,** Isolation and characterization of staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. FEMS Microbiol. Lett., 1990, 67, 201-206.

**Mestankova H., Mailhot G., Jirkovsky J., Krysa J., Bolte M.,** Mechanistic approach of the combined (iron- $\text{TiO}_2$ ) photocatalytic system for the degradation of pollutants in aqueous solution: an attempt of rationalisation. App. Cat., 2004, 57, 255-263.

**Min J.H., Hering J.G.,** Arsenate sorption by Fe(III)-doped alginate gels. Wat. Res., 1998, 32, 1544-1552.

**Mukerjee-Dhar G., Shimura M., Kimbara K.,** Degradation of polychlorinated biphenyl by cells of *Rhodococcus opacus* strain TSP203 immobilized in alginate and in solution. Enz. Microb. Techn., 1998, 23, 34-41.

**Nishikawa K., Machida H., Yamakoshi Y., Ohtomo R., Saito K., Saito M., Tominaga N.**, Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. *Plant Sci.*, 2006, 170, 307–313.

**Oren A., Mana L.**, Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter rubber*. *FEMS Microb. Lett.*, 2003, 223, 83 – 87.

**Oswald A.A., Griesbaum K., Hudson B.E.**, Organic sulfur compounds. XII. Factors Determining a 1,Z- vs. 1,4-Mechanism of Radical Reactions of Conjugated Dioléfins. Co-oxidation with Thiols by Oxygen. *J. Org. Chem.*, 1963, 28, 2355-2361.

**Packer L., Spath S., Martin J.B., Roby C., Bligny R.**,  $^{23}\text{Na}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR studies of the effects of salt stress on the freshwater *Cyanobacterium synechococcus* 6311. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 256, 354-361.

**Párkányi C., Abdelhamid A.O.**, Photodegradation of pesticide : photolysis of 2-mercaptobenzothiazole. *Heterocycle*, 1985, 23, 2917-2926.

**Pascaly M., Duda M., Schweppe F., Zurlinden K., Müller F.K., Krebs B.**, The systematic influence of tripodal ligands on the catechol cleaving activity of iron(III) containing model compounds for catechol 1,2-dioxygenases. *J. Chem. Soc.*, 2001, 828-837.

**Persmark M., Pittman P., Buyer J.S., Schwyn B., Gill P.R., Neilands J. B.**, Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 3950-3956.

**Philp J.C., Kuyukina M.S., Ishina I.B., Dunbar S.A., Christofio N., Lang S., Wray V.**, Alkanotrophic *Rhodococcus rubber* as a biosurfactant producer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 59, 318-324.

**Podsiadły R., Sokołowska J., Marcinek A., Zielonka J., Socha A., Kazmierska M.**, The relationship between the electrochemical and photochemical reduction of some azo dyes derived from 2-aminobenzothiazole. *J. Photochem. Photobiol.*, 2005, 171, 69-76.

**Portais, J.-C., Delort A.-M.**, Carbohydrate cycling in microorganisms: what can  $^{13}\text{C}$ -NMR tell us ? FEMS Microbiol. Rev., 2002, 26, 375-402.

**Prigent C., Corre C., Boyaval P.**, Production of concentrated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. J. Dairy Res., 1988, 55, 569-577.

**Rabaste F.**, Modifications de la perméabilité membranaire induite par la monensine sur *Enterococcus hirae* et par l'amphotéricine B sur *Candida albicans*. Etude par RMN *in vivo*. Thèse de l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), 1993, N° d'ordre : D.U. 1492.

**Rabaste F., Dauphin G., Guyot J., Jeminet G., Delort A.-M.**, Monensin-induced modifications of ionic gradients on *Streptococcus faecalis*. A  $^{23}\text{Na}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR study. J. Chim. Phys., 1992, 217-225.

**Rabaste F., Sancelme M., Delort A.M.**, Modifications of pH and  $\text{K}^+$  gradients in *Candida albicans* blastopores induced by Amphotericin B. A  $^{31}\text{P}$  NMR and  $\text{K}^+$  atomic absorption study. Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1268, 50-58.

**Ramos A., Neves A.R., Santos H.**, Metabolism of lactic acid bacteria studied by nuclear magnetic resonance. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 249-261.

**Ranalli G., Belli C., Lustrato G., Pizzella L., Liberatore L. Bressan M.**, Effects of combined chemical and biological treatments on the degradability of vulcanization accelerators. Wat. Air Soil Pollut., 2008, 192, 199-209.

**Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G., Jekel M.**, Microbial transformations and biological effects of fungicide-derived benzothiazoles determined in industrial wastewater. Environ. Sci. Technol., 1995, 29, 478-485.

**Repkina V.I., Dokudovskaya S.A., Umrikhina R.A., Samokhina V.A.**, Maximum permissible concentrations of benzothiazole and 2-mercaptobenzothiazole during biochemical treatment of wastewaters. Khim. Prom-st., 1983, 10, 598-599.

**Roberts G.A., Grogan G., Greter A., Flitsch S.L., Turner N.J.,** Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. J. Bacteriol., 2002, 184, 3898-3908.

**Santos V.L., Heilbuth N.L., Linardi V.R.,** Degradation of phenol by *Trichosporon* sp. LE3 cells immobilized in alginate. J. Basic Microbiol., 2001, 41, 171-172.

**Sarria V., Deront M., Péringer P., Pulgarin C.,** Degradation of biorecalcitrant dye precursor present in industrial wastewaters by a new integrated iron(III) photoassisted-biological treatment. Appl. Catalysis, 2003, 40, 231-246.

**Sax N. I.,** Dangerous properties of industrial materials, Van Nostrand Reinhold, New York, 1984.

**Seifert R.M., King D.A.,** Identification of some volatile constituents of *Aspergillus clavatus*. J. Agric. Food Chem., 1982, 30, 786-790.

**Sreeram K.J., Shrivastava H.Y., Unni Nair B.,** Studies on the nature of interaction of iron(III) with alginates. Biochim. Biophys. Acta, 2004, 1670, 121-125.

**Stookey L.L.,** Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. Anal. Chem., 1970, 42, 779-781.

**Suzuki T., Yamaguchi T., Ishida M.,** Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. Process Biochem., 1998, 33, 541-546.

**Timmerman W.,** Biological phosphorus removal in wastewater treatment. Microbiol. Sci., 1984, 149-152.

**Tran-Dinh S., Hervé M., Wietzerbin J.,** Determination of flux through different metabolite pathways in *Saccharomyces cerevisiae* by  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem., 1991, 201, 715-721.

**Trapani V., Patel V., Leong C.-O., Ciolino H.P., Yeh G.C., Hose C., Trepel J.B., Stevens M.F.G., Sausville E.A., Loaiza-Pérez A.I.,** DNA damage and cell cycle arrest induced by 2-(4-amino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazole (5F 203, NSC



703786) inattenuated in aryl hydrocarbon receptor deficient MCF-7 cells. *Brit. J. Cancer*, 2003, 88, 599-605.

**Tsunoda K.**, Laboratory evaluation of chemicals as wood preservatives (1) 2-(Thiocyanomethylthio) benzothiazole (TCMTB). *Wood Res.*, 1990, 77, 28-34.

**Vetting M.W., Ohlendorf D.H.**, The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure Fold. Des.*, 2000, 8, 429-440.

**Vitzthum O.G., Werkhoff P., Hubert P.**, New volatile constituents of black tea aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 1975, 23, 999-1003.

**Wackett L.P.**, Recruitment of co-metabolic enzymes for environmental detoxification of organohalides. *Environ. Health Perspect.*, 1995, 103, 45-48.

**Wallnöfer P., Tillmanns G., Thomas R., Wünsche C., Kurz J., Jarczyk H.J.**, Mikrobieller Abbau des Herbizids Methabenzthiazuron und Identifizierung der Metaboliten. *Chemosphere*, 1976, 5, 377-382.

**Wang G-S., Chen H-W., Kang S-F.**, Catalysed UV oxidation of organic pollutants in biologically treated waster effluent. *Sci. Total Environ.*, 2001, 277, 87-94.

**Welch D.I., Watts C.D.**, Collection and identification of trace organic compounds in atmospheric deposition from a semi rural site in the UK. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 1990, 38, 185-198.

**Willaert R.G., Baron G.V.**, Gel entrapment and micro-encapsulation: methods. *Applications and Engineering Principles. Rev. Chem. Eng.*, 1996, 12, 5-24.

**Zwicker N., Theobald U., Zahner H., Fiedler H.-P.**, Optimization of fermentation conditions for the production of ethylene-diamine-disuccinic acid by *Amycolatopsis orientalis*. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 19, 280-285.

## RESUME

La biodégradation du 2-aminobenzothiazole (ABT) a été comparée entre des bactéries en suspension dans l'eau et des bactéries immobilisées sur un support d'alginate. Trois processus de dégradation de l'ABT ont été étudiés : la photodégradation sous lumière solaire en présence du complexe Fe(III)-acide nitrilotriacétique (FeNTA), la biodégradation par la bactérie aérobie stricte *Rhodococcus rhodochrous* et la combinaison de ces deux processus. Le métabolisme de *R. rhodochrous* a été étudié par RMN *in vivo* du  $^{31}\text{P}$  et du  $^{13}\text{C}$  : des informations importantes sur le métabolisme phosphoré et carboné ont été obtenues. La réponse de la bactérie face à divers stress a été évaluée et a montré sa capacité d'adaptation aux variations environnementales. La spéciation du fer pour son rôle important dans l'activation de la biodégradation d'ABT a été étudiée : complexes organiques, oxydes et oxy(hydr)oxydes de fer ont été testés pour connaître les formes biodisponibles pour *R. rhodochrous*.

## ABSTRACT

The 2-aminobenzothiazole (ABT) degradation was compared between free suspended bacteria in water and bacteria immobilized on an alginate matrix. Three processes of ABT degradation were studied: the photodegradation under solar light in presence of the complex Fe(III)-nitrilotriacetic acid (FeNTA), the biodegradation by the strict aerobic bacterium *Rhodococcus rhodochrous* and the photobiodegradation by combining these two processes. *R. rhodochrous* metabolism was studied by *in vivo*  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR: information about phosphorous and carbonaceous metabolism were obtained. The bacterium response faced with different stresses was evaluated and showed its adaptation ability to the environment variations. The iron speciation for its important role in the activation of the ABT biodegradation was studied: organic complexes, iron oxides and oxy(hydr)oxides were tested to know the bioavailable forms for *R. rhodochrous*.